



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ**

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

**ÚSTAV MATERIÁLOVÝCH VĚD A INŽENÝRSTVÍ**

INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING

**VÍCEFÁZOVÉ BIOKERAMICKÉ PORÉZNÍ  
NÁHRADY KOSTNÍ TKÁNĚ NA BÁZI  
FOSFOREČNANŮ VÁPENATÝCH**

MULTI-PHASE POROUS BIO CERAMICS BONE SCAFFOLDS BASED ON  
CALCIUM PHOSPHATES

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Jana Smiešková

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

Ing. Přemysl Šťastný

BRNO 2018

# Zadání bakalářské práce

Ústav:	Ústav materiálových věd a inženýrství
Student:	<b>Jana Smiešková</b>
Studijní program:	Strojírenství
Studijní obor:	Základy strojního inženýrství
Vedoucí práce:	<b>Ing. Přemysl Šťastný</b>
Akademický rok:	2017/18

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č. 111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma bakalářské práce:

## **Vícefázové biokeramické porézní náhrady kostní tkáně na bázi fosforečnanů vápenatých**

### **Stručná charakteristika úkolu:**

U biokeramických implantátů s vícefázovou strukturou obsahující hydroxyapatit (HA) a fosforečnan vápenatý (TCP) lze, na rozdíl od jednofázových systémů, řídit rozpustnost a biologickou aktivitu vzájemným poměrem přítomných fází. Vícefázové systémy přinášejí možnost nahradit doposud běžně používané kostní štěpy uměle připraveným materiálem. Nahrazení kostních štěpů s sebou nese zkrácení operační doby, snížení pravděpodobnosti vzniku infekce a zkrácení doby rekonvalescence, což je významným přínosem jak pro zdravotnický personál, tak i pro samotného pacienta. Pro další výzkum a vývoj v této oblasti je tedy nutné shrnout současné poznatky z oblasti vícefázových biokeramických implantátů do podoby ucelené literární rešerše.

### **Cíle bakalářské práce:**

Vypracování přehledné literární rešerše se zaměřením na přípravu, vlastnosti a použití vícefázových keramických materiálů na bázi fosforečnanů vápenatých.

### **Seznam literatury:**

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates ( $\text{CaPO}_4$ ): occurrence and properties. Progress in Biomaterials. 2016, 5(1), 9-70. DOI: 10.1007/s40204-015-0045-z. ISBN 10.1007/s40204-015-0045-z. ISSN 2194-0509.

DOROZHKIN, S. V. Multiphasic calcium orthophosphate ( $\text{CaPO}_4$ ) bioceramics and their biomedical applications: occurrence and properties. Progress in Biomaterials. 2016, 5(1), 9-70. DOI: 10.1016/j.ceramint.2016.01.062. ISBN 10.1016/j.ceramint.2016.01.062. ISSN 2194-0509.

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2017/18

V Brně, dne 27. 10. 2017

---

prof. Ing. Ivo Dlouhý, CSc.  
ředitel ústavu

---

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.  
děkan fakulty

## **Abstrakt**

Bakalářská práce se zabývá shrnutím poznatků na téma: Vícefázové biokeramické porézní náhrady kostní tkáně na bázi fosforečnanů vápenatých. Práce je členěna do dvou částí. První část představuje literární rešerši, která se zabývá biokeramickými materiály na bázi fosforečnanů vápenatých a jejich interakcí s tělem příjemce. Druhá část je experimentální. Popisuje přípravu směsných keramik (jedná se o směsi hydroxyapatitu (HA) a fosforečnanu vápenatého (TCP)) a vyhodnocení jejich mikrostruktury a změn fázového složení.

**Klíčová slova:** porézní keramika, hydroxyapatit, fosforečnan vápenatý, scaffolds

## **Abstract**

This bachelor thesis summarizes findings on subject: Multi-phase porous bioceramics bone scaffolds based on calcium phosphates. The thesis is divided into two parts. The first part is a literary recherche speaking on topic: Tricalcium-phosphate-based bioceramic materials and their interaction with the body of the recipient. The second part is experimental. It describes the preparation of mixed ceramics (mixture of hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP)) and evaluation of their microstructure and changes of phase composition.

**Key words:** porous ceramics, hydroxyapatite, tricalcium phosphate, scaffolds

## **Bibliografická citace**

SMIEŠKOVÁ, J. Vícefázové biokeramické porézní náhrady kostní tkáně na bázi fosforečnanů vápenatých. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2018. 56 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Přemysl Šťastný.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma *Vícefázové biokeramické porézní náhrady kostní tkáně na bázi fosforečnanů vápenatých* vypracovala samostatně s použitím odborné literatury a pramenů, uvedených na seznamu, který tvoří přílohu této práce.

---

Datum

---

Jana Smiešková

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Přemyslu Šťastnému za jeho odborné vedení a cenné rady při tvorbě bakalářské práce. Práce byla vypracována pod záštitou CEITEC Nano Research Infrastructure (MEYS CR, 2016 – 2019) a za příspěví grantu STI-J-18-5307.

# Obsah

Abstrakt .....	3
Bibliografická citace.....	4
Prohlášení .....	5
Poděkování .....	6
Obsah .....	7
1 Úvod.....	9
2 Biomateriály.....	10
2.1 Vývoj biomateriálů .....	10
2.2 Druhy biomateriálů.....	11
2.2.1 Kovy.....	11
2.2.2 Polymery .....	12
2.2.3 Keramika.....	12
2.3 Biokeramika.....	12
2.4 Bionerní keramika .....	13
2.4.1 $\text{Al}_2\text{O}_3$ (oxid hlinitý).....	14
2.4.2 Oxid zirkoničitý ( $\text{ZrO}_2$ ) .....	14
2.5 Bioaktivní keramika .....	14
2.5.1 Hydroxyapatit (HA) .....	15
2.5.2 Fosforečnan vápenatý (Trialkciumfosfát , TCP) .....	16
2.5.3 Bioaktivní skla a sklokeramika .....	17
3 Porézní biokeramika .....	18
3.1 Metody výroby .....	19
3.1.1 Replikační metoda .....	19
3.1.2 Metoda přímého napěňování ( <i>in-situ</i> ).....	20
3.1.3 Metoda pórotvorné látky.....	20
3.1.4 Metody solid free-form fabrication (SFF) .....	21
3.2 Scaffoldy.....	22
3.2.1 Požadavky na scaffold .....	22
3.2.2 Bioaktivita.....	22
3.2.3 Osteoinduktivita a osteokonduktivita .....	23
3.2.4 Vstřebatelnost .....	23
3.3 Porozita a velikost pórů .....	23
3.3.1 Vliv porozity, velikosti pórů a vzájemné propojenosti.....	24
3.3.2 Vliv porozity na mechanické vlastnosti.....	24

3.4	Bioaktivní keramické pěny .....	25
4	Biologie kostí a interakce kostní tkáně s fosforečnanovými keramikami .....	27
4.1	Složení kosti .....	28
4.2	Reparace (hojení) kostí .....	29
4.3	Popis procesu hojení .....	29
4.4	Kostní štěpy .....	30
4.5	Interakce keramiky s kostní tkání .....	31
5	Směsné fosforečnanové keramiky .....	33
5.1	Materiály pro výrobu scaffoldů .....	33
5.1.1	Příprava směsných fosforečnanů vápenatých .....	33
5.1.2	Vliv fázového složení na bioaktivitu .....	34
5.2	Vlastnosti BCP .....	36
5.3	Optimální složení BCP .....	37
5.4	Biomedicínské využití .....	38
5.5	Dostupné komerční produkty .....	39
5.6	Další možné zlepšení bioaktivity porézních BCP .....	40
5.6.1	Chitosan .....	40
5.6.2	Kolagen .....	40
5.6.3	Polyfosforečnan .....	41
6	Experimentální cíle práce .....	43
7	Experimentální část .....	44
7.1	Složení a příprava keramických suspenzí .....	44
7.2	Příprava vzorků, sušení a tepelné zpracování .....	45
7.3	Příprava vzorků pro skenovací elektronový mikroskop (SEM) a rentgenovou difrakční analýzu (RTG) .....	45
8	Výsledky experimentů a jejich diskuze .....	46
9	Závěr .....	49
10	Použitá literatura .....	50



# 1 Úvod

Funkce lidské kosterní soustavy je důležitou součástí každodenního života. Během života se však jednotlivé části těla opotřebovávají nebo jsou poškozeny jako důsledek nemoci či úrazu. Snahou je tedy již nevyhovující tkáň nahradit a regenerovat.

Poškozené části lidského těla jsou nahrazeny tzv. implantáty, které musí splňovat různé požadavky. Nejdůležitější vlastností pro materiály používané v medicíně je biokompatibilita s lidským organismem. Takový materiál při začlenění do tkáně pacienta nevyvolává nežádoucí účinky. Některé aplikace vyžadují, aby implantáty v těle pacienta zůstaly trvale. Jindy je požadována pouze dočasná náhrada, proto je potom nutné implantát z těla chirurgicky odstranit nebo využít vstřebatelný materiál.

Mezi nejpoužívanější biomateriály patří kovy, polymery, kompozity a keramika. V současné době je použití biomateriálů poměrně rozsáhlé. Lze jimi nahradit tvrdé tělní tkáň (kosti nebo zuby), ale používají se i jako náhrada měkkých tkání, mezi které řadíme například cévy, šlachy či srdeční chlopně.

Vývoj biomateriálů neustále přináší nové materiály a především rozšiřuje pole jejich uplatnění. Příchod nové generace materiálů nenahradí ty předchozí, ale spíše poskytne další možnosti jejich využití díky odlišným vlastnostem.

Bakalářská práce se bude zabývat především biokeramickými porézními náhradami kostní tkáně. Použití keramiky v medicínských aplikacích začalo jejím využitím ve stomatologii. V současné době je však velká část výzkumu zaměřená na keramické podpůrné systémy (anglicky označované „scaffolds“). Jedná se o porézní bioaktivní keramické náhrady, které podporují růst kostní tkáně a tvoří pro ni oporu. Porozita umožňuje vrůst tkáně do implantátu a tím je dosaženo fixace v těle pacienta. Při použití vhodného materiálu dochází k degradaci struktury, která je nahrazena novou kostní tkání.

Za nejpoužívanější materiály určené pro náhradu kostní tkáně lze označit hydroxyapatit (HA) a fosforečnan vápenatý (TCP). Důvodem je především jejich podobnost s anorganickou složkou lidské kosti. V medicínské praxi se kromě těchto čistých látek využívají i jejich směsi, u kterých je možné díky použití vhodného poměru složek dosáhnout výhodnějších vlastností (rozpuštěnost, pevnost, atd.)

## 2 Biomateriály

Biomateriály nachází široké uplatnění v medicínské praxi. Slouží k nahrazení měkkých i tvrdých tkání lidského těla. Mohou být přírodní i syntetické. Biomateriály jsou specifické svou interakcí s okolní tkání.

Nezbytnou vlastností daného materiálu je biokompatibilita. Biokompatibilitu lze popsat jako míru tolerance biomateriálu s vnitřním prostředím těla. Zjišťuje se pomocí laboratorních testů, které můžeme rozdělit na dva druhy:

*In vitro* – jedná se o testování mimo živé organismy. Vzorky jsou vystaveny vlivu umělého fyziologického roztoku. Ve srovnání s druhou metodou může být toto testování do jisté míry zjednodušené. Simulované podmínky například vlivu hormonů a enzymů nejsou dokonale stejné jako v živém organismu. [1]

*In vivo* – jde o způsob testování, při kterém dochází k zavedení vzorků přímo do těla hostitele. Toto testování je objektivnější než testování *in vitro*. Často se jedná o konečnou fázi série pokusů popisující působení materiálu v interakci s tělním prostředím. [1]

### 2.1 Vývoj biomateriálů

Intenzivní vývoj biomateriálů, tak jak je chápeme dnes, probíhá od 60. let minulého století, kdy začal být kladen důraz na biokompatibilitu materiálů. Cílem bylo vytvořit materiál, který nezpůsobí negativní biologickou odezvu při umístění do fyziologického prostředí. Výsledkem byla tzv. první generace biomateriálů – biologicky inertní materiály.

U těchto materiálů nedochází k výrazné interakci s okolní tkání, ale jsou touto tkání tolerovány. Bioinertní materiál nevyvolává nežádoucí fyziologickou reakci. Prvními úspěšně používanými materiály byly kovy pro ortopedii (například nerezová ocel, titan a jeho slitiny). Dalším materiálem, který našel uplatnění, byla keramika. Sloužila zejména k výrobě zubních a kloubních implantátů. [2]

V 80. letech došlo k vývoji druhé generace materiálů. Pozornost byla zaměřena na bioaktivní složky materiálu, díky kterým došlo ke zlepšení interakce mezi tkání a povrchem implantátu. Dalším posunem ve vývoji bylo vytvoření biodegradabilních náhrad, které umožnily postupné vstřebání uvnitř těla pacienta a úplné nahrazení buňkami nové tělní tkáně. [3]

Na přelomu století se začala využívat trojrozměrná lešení (scaffolds). Jedná se o třetí generaci biomateriálů. Prostorová struktura přináší řadu výhod. Umožňuje dostatečnou vaskularizaci, adhezi a proliferaci buněk. Povrch scaffoldu je podporou pro buňky z těla pacienta, což při správném složení umožňuje jeho resorbovatelnost. V současné době je možné do struktury scaffoldu zabudovat i léčiva s postupným uvolňováním, která zajišťují lepší hojení. [4]

Budoucnost by měla přinést čtvrtou generaci biomateriálů (tzv. chytré bioaktivní materiály), které budou navíc schopné reagovat na mechanické a elektrické stimuly ve tkáni. Tento směr vývoje vychází ze známých piezoelektrických vlastností kostní tkáně. Jedná se tedy o piezoelektrické materiály, u nichž mechanická stimulace vyvolá elektrickou odezvu. [5, 6]

## 2.2 Druhy biomateriálů

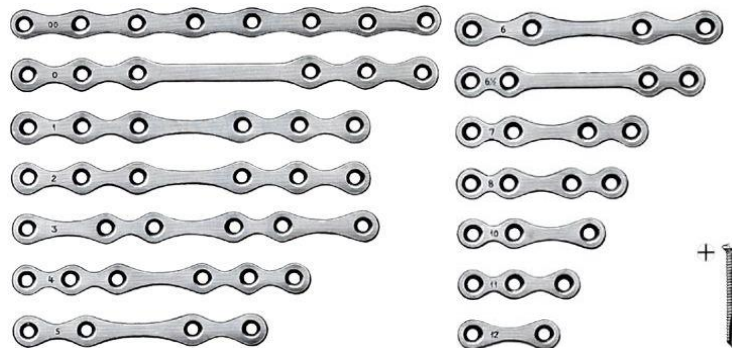
Dle typu lze biomateriály rozdělit do 3 skupin: kovy, keramika a polymery. Jednotlivé skupiny materiálů se odlišují svými vlastnostmi a podle toho také oblastí uplatnění v medicíně.

### 2.2.1 Kovy

Kovy tvoří v přírodě velkou skupinu s různými vlastnostmi. Jsou používány především kvůli své vysoké pevnosti a houževnatosti. Jejich nevýhodou je nižší biokompatibilita. Dalším problémem může být velký rozdíl mezi mechanickými vlastnostmi kovů a živých tkání. Pokud se zaměříme například na Youngův modul pružnosti, u kovu se jeho hodnota pohybuje v rozmezí 100-250 GPa, zatímco u lidské kosti je mnohonásobně menší (asi 20 GPa). [7]

Jako první se v medicíně využívaly čisté kovy (zlato a stříbro). Výhodou je dobrá odolnost proti korozi, avšak nevykazují dostatečnou tvrdost. Nevýhodou je i jejich cena. Pro dosažení lepších mechanických vlastností se používají různé slitiny. Ve slitinách se setkáváme obvykle se železem, titanem, niklem, molybdenem, kobaltem, chromem a manganem. [8]

Některé kovy se používají jako pasivní náhrady tvrdé tkáně. Využívají se pro výrobu zubních implantátů, kloubních náhrad, šroubů a jiných opor pro léčbu zlomenin kostí. První kovová slitina, která byla vyvinuta speciálně pro lidský organismus, byla vanadová ocel. Využívala se pro výrobu kovových destiček (Sherman plate) a šroubů pro léčbu různých typů zlomenin kostí. [9]



Obr. 1 Kovové destičky využívané pro hojení zlomenin (Sherman plate) [10]

Jako vhodný materiál pro výrobu implantátů se používají kovy, které jsou schopné pasivace (tvoří na povrchu ochrannou vrstvu před okolním prostředím). V současné době je pozornost zaměřena především na korozi-vzdornou ocel typu Cr-Ni-Mo, slitiny na bázi Ti nebo Co-Cr-Mo a částečně také na ušlechtilé kovy. [2]

### 2.2.2 Polymery

Polymery jsou makromolekulární látky. Představují nejširší třídu biomateriálů. Polymery jsou tvořeny dlouhými řetězci, které se skládají z neustále se opakujících jednotek (monomerů).

Největší výhodou polymerů v porovnání s kovy a keramikou jsou rozumné náklady na výrobu a dostupnost. Polymerní biomateriály se využívají díky své pružnosti a nízké hustotě. Nevýhodou je nízká mechanická pevnost a odolnost, takže se postupem času opotřebovávají. [11]

Polymery můžeme rozdělit na přírodní a syntetické. Přírodní polymery tvoří stavební materiál živých tkání. Umožňují buňkám přilnout a přirůst k povrchu implantátu. Pro tkáňové inženýrství se používají například kolagen, fibrin, chitosan a kyselina hyaluronová. Mezi nejběžnější syntetické polymery, se kterými je možné se setkat v kostním tkáňovém inženýrství, jsou polymery na bázi kyseliny polymléčné (PLA) a glykolové (PGA). [11]

Polymery jsou v lékařství velmi rozšířené a lze je použít pro různé specifické aplikace: kolena, kyčle a další klouby (polyetylen, silikony), krevní cévy (polyester, polytetrafluoroetylen, polyvinylchlorid), kardiostimulátory (acetal, polyetylen, polyuretan), kostní cement (polymethylmetakrylát), atd. [12]

### 2.2.3 Keramika

Keramika v tradiční formě je lidem známá již po tisíce let. Slovo keramika je řeckého původu a pochází ze slova „keramos“. Ve starověkém Řecku to bylo označení pro hlínu a hrnčířské výrobky. Až donedávna však bylo využití keramických materiálů značně omezené, a to zejména kvůli vlastní křehkosti, citlivosti na mikrotrhliny a jiné defekty, nízké pevnosti v tahu a nízké houževnatosti. Nicméně během posledních 100 let byly vyvinuty inovativnější metody výroby a vznikají tak materiály s mnohem lepšími vlastnostmi. [2]

Vlastnosti keramiky jsou podmíněny jejím chemickým složením, ale velký vliv zde hraje také mikrostruktura. Mechanické vlastnosti mohou být ovlivněny zrnitostí a čistotou výchozích surovin a technologií zpracování. Obecně lze říci, že čím je zrna jemnější, tím má výsledná keramika lepší vlastnosti.

Mezi nejvýznamnější vlastnosti keramických materiálů je možné zařadit chemickou odolnost, dobrou pevnost v tlaku, otěruvzdornost nebo odolnost proti oxidaci a korozi. Keramika je výborným tepelným a elektrickým izolantem. Na druhé straně velkou nevýhodou keramiky je její křehkost, obtížná opracovatelnost a špatné plastické chování. [7]

V současné době je keramika považována za jeden z nejvhodnějších materiálů pro medicínské aplikace, které jsou určeny k náhradě kostní tkáně. Jedná se především o porézní kostní implantáty (tzv. scaffolds) a zubní implantáty.

## 2.3 Biokeramika

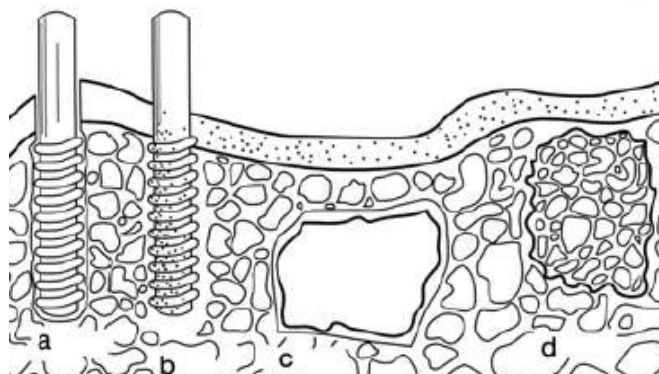
Biokeramika je významnou skupinou biomateriálů díky svým specifickým vlastnostem. Existuje celá řada biokeramik a poskytuje mnoho rozdílných vlastností upotřebených při léčbě. V mnoha biomedicínských aplikacích je keramika používána ve formě hutných nebo porézních materiálů se specifickým tvarem jako implantáty, protézy nebo protetické pomůcky.

Jedním z hlavních důvodů, proč se keramika v lékařské praxi používá, je její vysoká kompatibilita s tělním prostředím. Reakce organismu na přítomnost implantátu závisí zejména na vlastnostech daného materiálu. Závisí na chemické povaze (druhu atomů a typu vazeb) a na struktuře jeho povrchu. [3]

V případě degradace implantátu dochází k uvolňování iontů do okolní tkáně. Taková keramika musí být tvořena ionty, které jsou obsaženy i v lidském těle. Implantáty vyrobené z keramického materiálu jsou potom netoxické - nedochází k intoxikaci okolní tkáně a tvorbě zánětu. [3]

Všeobecně nelze označit mechanické vlastnosti biokeramiky za srovnatelné s vlastnostmi lidské kosti. Nesourodost mezi kostí a implantátem se projeví zejména v elastickém modulu keramických materiálů a jejich houževnatosti. Keramika má výrazně vyšší modul pružnosti oproti kosti. [3]

Žádný umělý materiál, který je do těla uměle implantován, nemůže být zcela biokompatibilní. Pouze látky vyrobené daným organismem nezpůsobují žádnou nepřírozenou reakci s tělní tkání. Biokeramické materiály lze rozdělit z hlediska interakce s živou tkání na bioinertní a bioaktivní.



Obr. 2 Rozdělení biokeramiky podle biologického chování: (a) bioinertní zubní implantát z oxidu hlinitého, (b) bioaktivní povlak hydroxyapatitu na kovovém zubním implantátu, (c) povrchově aktivní biosklo, (d) biologicky rozložitelný implantát z fosforečnanu vápenatého ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) [13]

## 2.4 Bioinertní keramika

Bioinertní keramika ani během dlouhého období neprochází žádnými chemickými změnami a kost se s implantátem nespojí chemickou vazbou. Bioinertní materiály organismus nepovažuje za vlastní, ale nedochází k žádné nevhodné reakci a živá tkáň tyto materiály toleruje. Tělo izoluje tyto materiály tvorbou fibrózní tkáně, dojde ke vzniku velmi tenké (několik mikrometrů nebo méně) vláknité membrány, která obklopuje materiál implantátu. [14]

Mezi nejběžnější bioinertní keramiku patří oxid hlinitý ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) a oxid zirkoničitý ( $\text{ZrO}_2$ ). Nejsou rozpustné v tělních tekutinách a vyznačují se větší tvrdostí než má ocel. Bioinertní keramiky vykazují všeobecně lepší mechanické vlastnosti než keramiky bioaktivní, a tudíž se užívají zejména na mechanicky namáhané aplikace. [14]

### 2.4.1 $\text{Al}_2\text{O}_3$ (oxid hlinitý)

Oxid hlinitý patří mezi první klinicky používané biomateriály. Existuje v několika modifikacích, ale nejběžnější je  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ , ve které krystalizuje korund (má romboedrickou krystalickou mřížku). Oxid hlinitý se vyskytuje v podobě monokrystalů nebo polykrystalů. Většina implantátů je tvořena z polykrystalického  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , ale existují i některé vyrobené s monokrystalického safíru. [15, 16]

Oxid hlinitý se používá pro výrobu třecích ploch kyčelních protéz a zubních implantátů. Tento materiál se vyznačuje kombinací vynikající odolnosti proti korozi, dobrou biologickou kompatibilitou, vysokou odolností proti opotřebení a vysokou pevností, ale vykazuje střední ohybovou pevnost a houževnatost. Při zahřívání nedochází k plastické deformaci a materiál je proto křehký, což omezuje jeho použití při zatěžování tlakem. [15, 16]



*Obr. 3 Oxid hlinitý používaný při náhradě kyčelního kloubu [16]*

### 2.4.2 Oxid zirkoničitý ( $\text{ZrO}_2$ )

Oxid zirkoničitý je bioinertní materiál. Zirkonové keramiky mají výhodu oproti  $\text{Al}_2\text{O}_3$  keramice, vykazují totiž vyšší pevnost v ohybu a nižší Youngův modul (zpevnění díky fázové transformaci). Lze je využít pro nosné plochy v celkových protézách kyčelního kloubu. [15]

$\text{ZrO}_2$  je polymorfní materiál. Může se vyskytovat ve třech typech krystalické mřížky, které se se změnou teploty mění. Čistý oxid zirkoničitý má při pokojové teplotě monoklinickou krystalickou mřížku, která je stálá až do teploty  $1170^\circ\text{C}$ . Poté se nachází v tetragonální krystalické mřížce až do teploty  $2370^\circ\text{C}$ , kde se mřížka mění na kubickou. Podle typu zpracování a způsobu ochlazování přechází okolo teploty  $970^\circ\text{C}$  mřížka tetragonální zpět na monoklinickou. Pokud přidáme stabilizační oxidy, je možné pracovat s tetragonální mřížkou i za pokojové teploty. [13, 15]

## 2.5 Bioaktivní keramika

Bioaktivní materiály umožňují na rozdíl od bioinertní keramiky vytvořit pevnou chemickou vazbu mezi kostní tkání a implantátem. Vyvolávají specifickou biologickou odpověď, která vede posléze ke vzniku *de novo* tvořené mineralizované kosti.

Mezi nejvhodnější a nejpoužívanější bioaktivní materiály patří keramika na bázi fosforečnanu vápenatého. Jedná se především o HA (hydroxyapatit) a TCP (fosforečnan vápenatý). Dále sem můžeme zařadit také speciální druhy bioskel a sklokeramiky. Bioaktivní keramické a sklokeramické materiály jsou obvykle používány na mechanicky nenamáhané aplikace. [15]

### 2.5.1 Hydroxyapatit (HA)

Pojem „apatit“ pochází z řeckého apatê, což znamená klam či podvod. Toto označení bylo použito pro jeho rozmanitost (co se tvarů a barev týká). Termín "apatit" popisuje skupinu sloučenin majících podobné struktury, ale nemusí nutně mít identické složení.

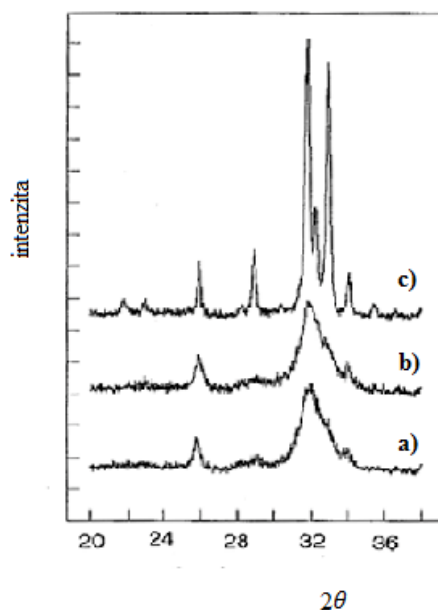
HA je krystalická látka, jejíž vzorec je  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  se stechiometrickým poměrem  $\text{Ca/P} = 1,67$ . Obvykle se ale uvádí vzorec  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , protože elementární buňka obsahuje dvě základní jednotky. HA krystalizuje v hexagonální soustavě. Skupiny OH bývají často nahrazovány jinými ionty ( $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ). [17], [18]



Obr. 4 Fluoroapatit [19]

Hydroxyapatit se často vyskytuje i ve své nestechiometrické formě. Lze ji zapsat vzorcem  $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6-x(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ , kde  $x$  nabývá hodnoty v rozsahu 0 až 1. Poměr  $\text{Ca/P}$  se pohybuje v rozmezí 1,5 až 1,67. Nestechiometrická forma HA obsahuje kationtové  $\text{Ca}^{2+}$  a aniontové  $\text{OH}^-$  vakance v základní krystalové struktuře HA. [18, 19]

HA je využíván kvůli své podobnosti anorganické složce kosti. V kostech člověka a jiných savců je jeho zastoupení přibližně 60%, v zubní sklovině dokonce až 90%. Při teplotě  $37^\circ\text{C}$ , přibližně neutrálním pH a kontaktu s vodou jde o nejstabilnější formu fosforečnanové keramiky. [17]



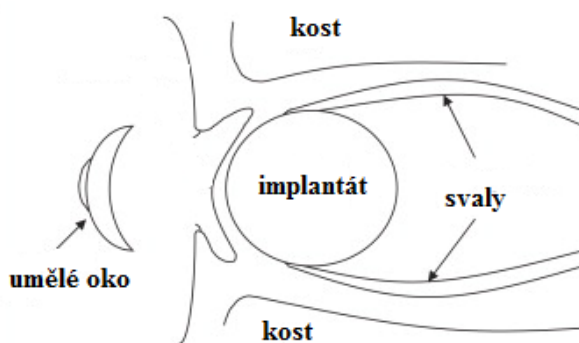
Obr. 5 Rentgenové difrakční vzory a) kosti, b) zuboviny a c) skloviny [21]

Hlavními nedostatky hydroxyapatitové keramiky jsou špatné mechanické vlastnosti, které nedosahují pevnostních parametrů lidské kosti. Z tohoto důvodu se implantáty používají jen v místech, která mají nízké mechanické zatížení, a obvykle se jedná jen o náhrady menších rozměrů. [15]

Používá se pro mnoho druhů hutných a porézních implantátů nebo jako povrchová úprava implantátů z jiných materiálů. Povlakování je z technologického hlediska poměrně nelehký úkol, ale umožňuje takto upravenému implantátu zkrátit období vhojení, kdy se mezi HA a kostí tvoří pevná biologická vazba.

Zajímavou aplikací, se kterou se můžeme setkat, je oční protéza. Označuje se jako tzv. „bio-oko“. Tato oční protéza výrazně převyšuje svými vlastnostmi běžné protézy. Oční svaly navázané na bioaktivní implantát se pohybují stejně jako svaly ovládající pohyb bulvy zdravého oka. [22, 22]

Komerční HA produkty biologického původu jsou vyráběny z korálů nebo kostí skotu. Synteticky lze HA získat různými způsoby: reakce v pevné fázi, hydrotermální reakce, zhutňování a slinování prášku HA připraveného srážkovými nebo hydrolyzními reakcemi, či sol-gel metodou.



Obr. 6 Schéma aplikace očního implantátu [22]

## 2.5.2 Fosforečnan vápenatý (TCP)

TCP je anorganická látka, která má chemický vzorec  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Tento krystalický materiál se může vyskytovat ve třech polymorfních formách ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ ), a to v závislosti na teplotě či obsahu dopantů (např. Mg).

Vysokoteplotní forma  $\alpha'$  má hexagonální krystalickou mřížku a je stabilní pouze za teplot, které jsou vyšší než  $1430^\circ\text{C}$ , proto ji v praxi nelze využívat. Pokud dojde ke snížení teploty, dochází ke změně na fázi  $\alpha$ . Fáze  $\beta$  má romboedrickou mřížku a je stabilní za pokojových teplot. Při teplotách nad  $1250^\circ\text{C}$  se mění na fázi  $\alpha$ .  $\alpha$ - forma má monoklinickou mřížku. Při ochlazování ji však lze stabilizovat také při pokojových teplotách. [24]

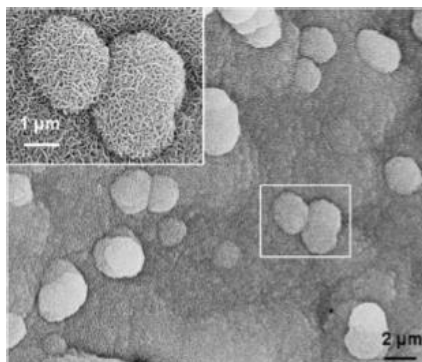
Mezi  $\alpha$  a  $\beta$  modifikacemi existují rozdíly v chemických i biologických vlastnostech. Liší se především svojí hustotou a rozpustností v tělních tekutinách. Fáze  $\alpha$  je reaktivnější a více rozpustná. Používá se jako složka pro přípravu kostních cementů. Fáze  $\beta$  je stabilnější a je jedním z nejstarších syntetických materiálů, které se používají pro náhradu kostí. [24]



### 2.5.3 Bioaktivní skla a sklokeramika

Bioaktivní sklo je amorfni materiál, který je chemicky aktivní a příznivě reaguje s okolními tkáněmi. Pomocí chemických vazeb dochází k uchycení implantátu v měkkých i tvrdých tkáních. Podstatou je vznik biologicky aktivní vrstvy uhličitanového hydroxyapatitu (HCA). [25]

Sklokeramika je definována jako kompozit tvořený krystalickou fází, která se nachází uvnitř amorfni skelné matrice. Přípravuje se kontrolovanou krystalizací skla za vysokých teplot. [25]



*Obr. 7 Typická morfologie hydroxyapatitu vytvořená na povrchu bioaktivního skla 45S5 po 28 dnech ponoření do simulované tělní tekutiny [26]*

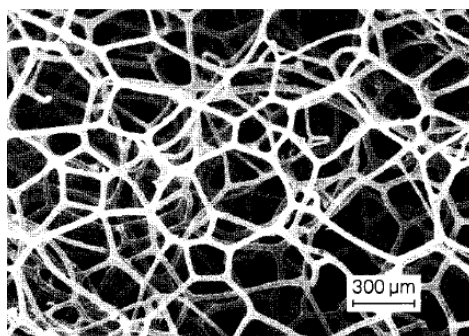
První bioaktivní sklo bylo objeveno v roce 1969 a zasloužil se o to profesor Larry Hench. Jednalo se o vůbec první bioaktivní materiál, který měl velký vliv na rozvoj tkáňového inženýrství. Tento materiál se stal později známý pod označením 45S5 nebo jeho komerčním názvem Bioglass®. Je tvořen ze 45 %  $\text{SiO}_2$ , 24,5 %  $\text{Na}_2\text{O}$ , 24,5 %  $\text{CaO}$  a 6 %  $\text{P}_2\text{O}_5$ . [27]

Bioaktivní skla jsou ve srovnání s vlastnostmi přirozené kostní tkáně velmi křehká, proto se pracuje na úpravách v jejich složení, aby došlo ke zlepšení mechanických vlastností. Původní biosklo 45S5 bylo použito na opravu kostních defektů v čelisti a v ortopedii u velkého množství pacientů, ale stále se nedaří rozšířit jeho využití pro regeneraci kostí. Zubní lékaři a ortopedové většinou využívají bioaktivní skla ve formě prášku nebo granulí z důvodu snadnější manipulace a širší možnosti jeho aplikace. [27]

### 3 Porézní biokeramika

V přírodě se porézní materiály vyskytují již od pradávna, proto lze předpokládat, že evoluce přinesla strukturu s výhodnými vlastnostmi a funkcí, aby dokázala odolávat nepříznivým vlivům. Mezi přírodní porézní struktury patří například korek, kosti, korály, houby nebo stonky rostlin.

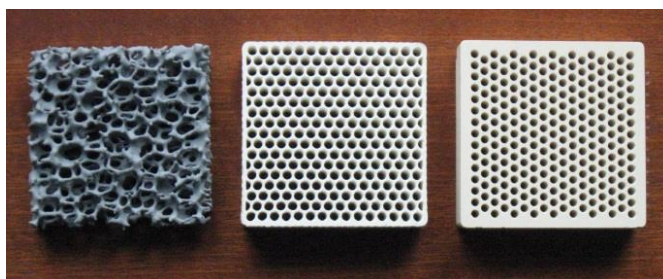
Průmysl ve většině případů využívá hutné keramické materiály. Příčinou je statistická povaha křehkosti keramiky. V poslední době nachází i porézní struktury stále více své uplatnění. Za důvod, proč jsou porézní materiály často upřednostňovány, lze označit především výhodný poměr mezi jejich hmotností, tvrdostí a pevností.



*Obr. 8 Přírodní porézní struktura – mořská houba [28]*

V technické praxi se porézní keramika využívá zejména kvůli dalším vlastnostem jako je dobrá chemická odolnost, vysoký bod tání nebo malá tepelná vodivost. Velkou nevýhodou tohoto materiálu je však jeho křehkost, která vede k horším výsledkům při mechanickém namáhání. [25]

Porézní keramické pěny s uzavřenou pórovitostí jsou většinou používány pro tepelnou izolaci. Materiály s otevřenou pórovitostí nachází uplatnění v aplikacích, které využívají transport kapalin či plynů (např. nosiče katalyzátorů nebo filtry pro roztavený kov). [29]



*Obr. 9 Filtry z keramické pěny [30]*

Kromě technických aplikací se porézní keramické materiály používají i v lékařství. Speciální oblastí, kde dochází k jejich využívání, je výroba různých biomateriálů především pro tkáňové kostní inženýrství. Díky svým vlastnostem (výborná osteokonduktivita, bioaktivita, biodegradabilita) přináší zcela nové možnosti v rekonstrukcích a léčbě kostních poranění. [15]

Díky širokým možnostem uplatnění porézních struktur bylo vyvinuto několik metod na jejich výrobu. Z hlediska odbornosti a dostatečných praktických zkušeností patří technologická příprava a syntéza biokeramických materiálů mezi náročné výrobní postupy.

### 3.1 Metody výroby

Metody pro výrobu porézní biokeramiky umožňují napodobit 3D strukturu lidské kostní tkáně a některé z jejích charakteristik. Výsledná kvalita a struktura nově vzniklého biomateriálu závisí na druhu použité metody. Získáme strukturu lišící se tvarem, velikostí a celkovou porozitou. Velikost pórů a jejich propojení se odráží na relativní hustotě materiálu, která ovlivňuje mechanickou pevnost.

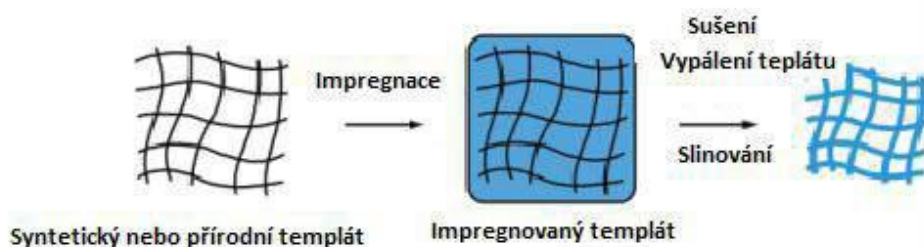
Mezi nejdůležitější faktory přípravy patří syntéza keramických prášků. Vyžaduje se jejich čistota, monodisperznost a kulový tvar. Postup výroby porézní keramiky se obecně skládá z vytvoření prvotní směsi, ze které díky tvarování získáme požadovanou porézní strukturu. Potom následuje vysoušení, odstranění pojiv a slinování. [22]

#### 3.1.1 Replikační metoda

Většina porézních materiálů je v současnosti průmyslově vyráběna právě touto metodou. Počátky jejího využívání spadají do roku 1963 a velkou výhodou je její jednoduchost. [30]

Výroba spočívá ve smáčení šablony (templátu) v keramické suspenzi. Šablonu obvykle tvoří polymerní pěna na bázi polyuretanu, polyvinylchloridu či polystyrenu nebo přírodní materiály (dřevo, korály, rostlinné stonky...). Templát by měl být dostatečně flexibilní a schopen zachovat původní tvar i po nanesení suspenze. Hlavní výhodou přírodních šablon je jejich složitá morfologie, kterou je obtížné připravit uměle. [32]

Aby bylo možné šablonu dobře smáčet, je žádoucí minimální velikost pórů přibližně 200  $\mu\text{m}$ . Následuje sušení a vypálení při teplotách 300–800 °C a slinování při teplotách vyšších než 1000 °C. Tím získáme požadovanou strukturu, kterou tvoří jednotlivé duté trámečky.

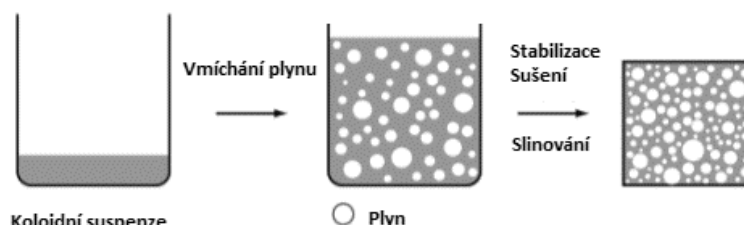


Obr. 10 Princip replikační metody [32]

Vypalování musí probíhat dostatečně pomalu, aby nedošlo k popraskání struktury zplyňováním polymeru. Vzniklé trhliny jsou koncentrátoři napětí a negativně ovlivňují mechanické vlastnosti. Ke zlepšení odolnosti vůči vzniku defektů ve struktuře jsou do keramické suspenze přidána pojiva. [32]

### 3.1.2 Metoda přímého napěňování (*in-situ*)

Jednou z jednoduchých a nízkonákladových metod výroby porézního materiálu je metoda přímého pění keramické suspenze. Základem je začlenění plynné fáze do koloidní suspenze během míchání a šlehání. Jakmile suspenze ztvdne a vysuší se, keramika si zachová výsledné kulovité póry. Výsledná porozita tedy závisí na množství obsaženého plynu. Tímto postupem je možné dosáhnout pórovitosti až 95%.



Obr. 11 Princip metody přímého napěňování [32]

Největším problémem při používání této metody je nestabilita pěny, která vede k degradaci struktury a tím ke zhoršení výsledných vlastností materiálu. Vlhké pěny jsou termodynamicky nestabilní a podléhají tzv. Oswaldovu zrání. To vede k nárůstu velikosti pórů.

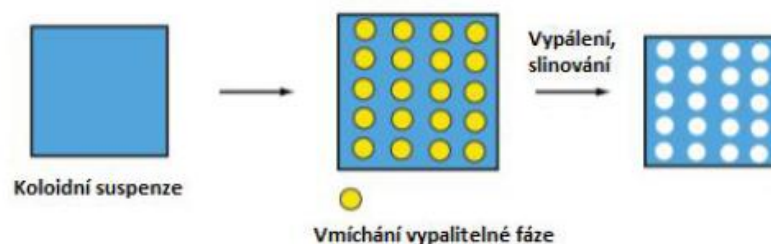
Z toho důvodu je směs nutné stabilizovat. Může proběhnout dvěma způsoby: stabilizace povrchově aktivními látkami nebo stabilizace drobnými částicemi. Stabilizace povrchově aktivními látkami probíhá díky molekulám, které se vážou na rozhraní koloid-plyn. Toto mezifázové rozhraní stabilizují díky snižování povrchového napětí. Stabilita pěny obvykle trvá desítky minut. [32]

Stabilitu pěny je možno získat i pomocí drobných částic. Jejich částečná nesmáčivost umožňuje uchycení na mezifázovém rozhraní, kde brání koalescenci a disproportionaci pěny. Pro částice je energeticky výhodné nahradit část vysokoenergetického rozhraní pevná látka-tekutina za rozhraní pevná látka-plyn. Stabilita vydrží několik dní. Při stabilizaci drobnými částicemi se získaný materiál vyznačuje větší pevností a menší velikostí pórů než u druhého způsobu stabilizace. [32]

### 3.1.3 Metoda pórotvorné látky

Základem této metody je vytvoření kompozitu ze dvou fází (suspenze a templátu). Příkladem je dvoufázový kompozit, který se skládá z keramického roztoku a pórotvorné přísady na bázi polymeru, grafitu nebo škrobu. Pórovité struktury docílíme zahřátím kompozitu na teplotu, při které dochází k degradaci rozptýlené fáze. Materiál je spálen a spaliny unikají do okolí. [32]

Výsledný keramický materiál, který touto metodou získáme, obsahuje póry v místech, kde se dříve nacházely částice polymeru. Porozita u takto připravených biokeramik se pohybuje mezi 20 – 90 %, velikost pórů v rozmezí 1 až 700  $\mu\text{m}$ . Velkou výhodou této metody je možnost odlévání suspenze do forem, proto není nutné řešit otázku stabilizace pěny. Nevýhodou metody pórotvorné látky je špatná vzájemná propojitelnost pórů při nízkých obsazích pórotvorné látky. [32]



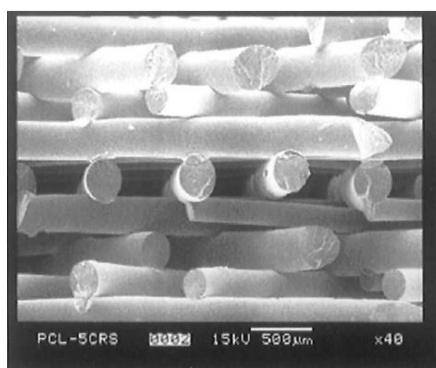
Obr. 12 Princip metody pórotvorné látky [32]

### 3.1.4 Metody solid free-form fabrication (SFF)

Metody solid free-form fabrication (SFF) se často označují také jako rapid prototyping (RP). Tyto metody umožňují vyrábět 3D keramické díly přesně podle počítačového modelu. Výhodou je, že pro výchozí polotovár není potřeba forma. Jedná se o technologie, které vytváří výrobek tzv. aditivním způsobem. Materiál se neubírá ani nepřidává najednou, ale požadovaný objekt vzniká postupným nanášením jednotlivých vrstev materiálu.

Díky těmto metodám lze zhotovit implantáty složitých tvarů, s přesnou velikostí pórů a požadovanou strukturou. To vede k výrazně lepším mechanickým vlastnostem implantátu než u běžných metod. Náhrady je možné přizpůsobit potřebám jednotlivých pacientů.

Mezi nejčastěji používané techniky patří 3D tisk, stereolitografie, robocasting, selektivní laserové spékání (SLS) nebo tání (SLM) a tavící nanášení (FDC).



Obr. 13 Vytvořená struktura pomocí RP [33]

### 3D tisk

3D tisk je technologie, která využívá digitálních dat 3D modelů. Tato data jsou zpracována a následně je z nich vytištěn požadovaný tvar. Princip spočívá v rozprostírání keramického prášku za pomoci trysky vrstvu po vrstvě. Každá vzniklá vrstva je vždy pokryta vrstvou vhodného pojiva (polymeru). Po dokončení modelu dojde k tepelnému vytvrzení pojiva, jeho vypálení a slinování modelu. [34]

V posledních letech nalézá 3D tisk stále více nových možností uplatnění v různých oblastech (od strojírenského průmyslu a stavebnictví až po zdravotnictví). Budoucností 3D tisku by mohl být tisk lidských orgánů. Zde je důležité replikovat nejen tvar, ale především jejich funkci. Proto se zkoumají možnosti tisknutí z živého materiálu (z lidských buněk). [35]

## **Stereolitografie (SLA)**

Představuje nejstarší a nejrozšířenější metodu. Jedná se o první rapid prototyping proces, který byl zaveden v roce 1988 firmou 3D Systems, založenou vynálezcem Charlesem Hullem.

Typickým znakem stereolitografie je výchozí tekutý polotovar - koloid. Tato technologie je založena na laserovém procesu, který vytváří ultrafialový paprsek. Záření vytváří na hladině koloidu jednotlivé vrstvy vytvrzeného materiálu. Materiál je vytvrzován přesně v místě, kde se nachází laserový paprsek. Jakmile je daná vrstva dokončena, posouvá se platforma hlouběji do nádrže a následuje tvorba další vrstvy. Takto se celý proces opakuje, dokud není vytvořen požadovaný objekt. Hotový keramický výrobek vzniká odstraněním polymerního pojiva a slinováním. [34]

## **3.2 Scaffoldy**

Tkáňové inženýrství je rychle se rozvíjející obor, který se využívá k opravě nebo regeneraci poškozených tkání s minimem chirurgických zásahů. Zahrnuje použití podpůrných systémů tzv. "scaffoldů", pochází z anglického slova "scaffolds" (lešení), které usnadňují růst kostních buněk.

Velkou motivací k používání scaffoldů je nedostatek kostních štěpů a minimální riziko imunitní reakce organismu. Prostorová struktura poskytuje prostor pro přepravu kyslíku a živin, uchycení kostních buněk a jejich následnou proliferaci a růst.

### **3.2.1 Požadavky na scaffold**

Scaffold má za úkol poskytovat mechanickou oporu pro buňky, proto je z hlediska mechanických vlastností nutná jeho dostatečná pevnost a lomová houževnatost. Je však běžné, že mechanická pevnost klesá s nárůstem pórovitosti, která má však pozitivní vliv na vrůstání tkáně do implantátu. Kromě velikosti pórů záleží také na jejich vzájemném propojení. [35]

Zvýšení velikosti propojení má za následek snížení pevnosti v tlaku, protože zvýšení propojení s konstantní velikostí pórů vede k nárůstu poréznosti. Z toho důvodu je potřeba najít určitý kompromis mezi jednotlivými vlastnostmi, při kterém by mechanické vlastnosti scaffoldu měly odpovídat mechanickým vlastnostem kosti. [35]

### **3.2.2 Bioaktivita**

Jakýkoliv materiál, který si organismus sám nevytvoří, ale je do něj uměle implantován, vyvolává řadu biochemických a biofyzikálních reakcí. Postupně vzniká stabilní mezifázové rozhraní implantát-tkáň.

Za jednu z hlavních osobností, které se zasloužili o rozmach ve vývoji biokeramiky, je považován profesor Larry Hench. Objevil podstatu bioaktivity, což vedlo ke vzniku mnoha bioaktivních materiálů založených na bázi keramiky. [37]

Míra bioaktivity je určena časem, během kterého se vytvoří vazby mezi více než polovinou mezifázového rozhraní. Mechanismus vazby se popisuje jako časově závislá kinetická změna povrchu implantátu, která začíná ve chvíli zavedení implantátu do organismu.

### 3.2.3 Osteoinduktivita a osteokonduktivita

Můžeme rozlišit osteoinduktivní a osteokonduktivní bioaktivní materiály. Toto rozdělení prezentoval profesor Larry Hench v sedmdesátých letech dvacátého století.

Osteokonduktivita je schopnost materiálu sloužit jako lešení vedoucí k tvorbě nově tvarovaných kostí podél jejich povrchů. Tato strukturální podpora umožňuje růst cév a osteoblastů tak, že dochází ke spojení s hostitelskou tkání. Důležité strukturní vlastnosti zahrnují porozitu, velikost pórů a drsnost povrchu. [38]

Osteoinduktivní materiál vyvolává svou přítomností a svým působením růst kostních buněk i při implantaci mimo kostní tkáň. [38]

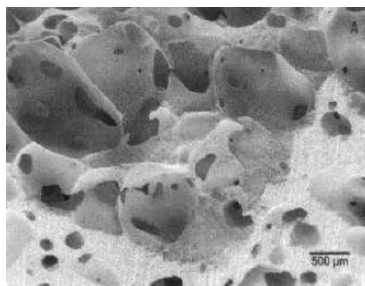
### 3.2.4 Vstřebatelnost

Porézní biokeramika díky své nedostatečné pevnosti nemůže sloužit jako trvalá náhrada, ale musí být vstřebatelná. Během procesu degradace současně dochází ke vzniku nové kostní tkáně, proto rychlost degradace musí odpovídat rychlosti růstu nové tkáně. Postupná degradace uvolňuje velké množství materiálu do tkáně a tím se vytváří prostor pro její růst. Materiál však nesmí být pro organismus toxický. Ideálně slouží jako stavební hmota pro novou tkáň. [38]

## 3.3 Porozita a velikost pórů

Při vytváření kostní tkáně uvnitř keramického scaffoldu hraje zásadní roli kromě celkové porozity materiálu také velikost a tvar pórů. Ideální struktura scaffoldu dosud nebyla jednoznačně definována a v literatuře se lze setkat s rozdílnými informacemi ohledně biologické odezvy.

Porozitu lze definovat jako procento volného objemu v pevném materiálu. Můžeme rozlišit makroporozitu (velikost pórů  $> 10 \mu\text{m}$ ) a mikroporozitu (velikost pórů  $< 10 \mu\text{m}$ ). Makroporozita ovlivňuje osteogenezi a mikroporozita podporuje uchycování buněk a signálních bílkovin na scaffold.



*Obr. 14 Makro a mikroporozita na lomových plochách vzorků TCP [40]*



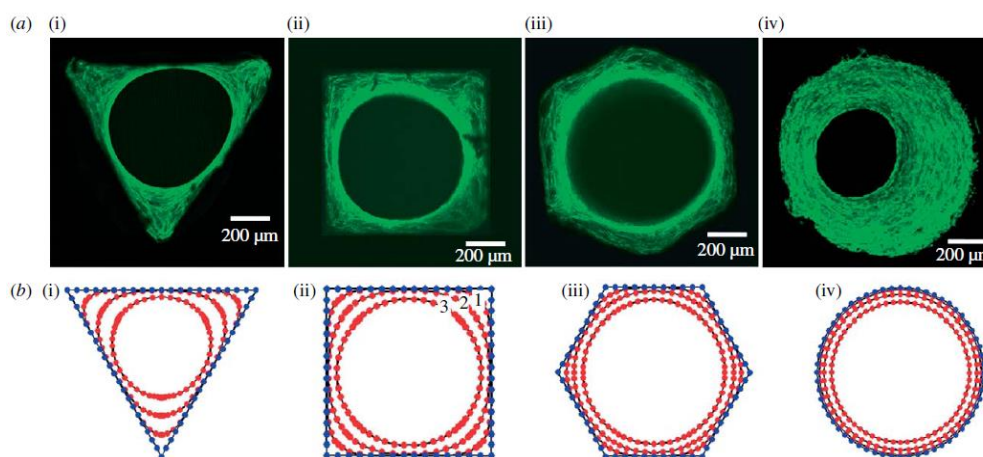
### 3.3.1 Vliv porozity, velikosti pórů a vzájemné propojenosti

Porozita ovlivňuje rychlost upevnění implantátu v těle a rychlost vrůstu nové kostní tkáně, protože představuje volný prostor pro vznik nové tkáně. Rychlost však není určena pouze samotnou porozitou, ale velkou roli hraje především dostatečná velikost pórů. [8]

Průměrná velikost osteonů v lidském těle je přibližně 220  $\mu\text{m}$ . Aby došlo k zajištění dostatečné hloubky vrůstu kostní tkáně a její vaskularizaci, minimální velikost pórů by měla být alespoň 300  $\mu\text{m}$ . Při nedostatečné velikosti hrozí riziko zaškrcení vznikajících cév. Nicméně narůstající porozita vede ke zhoršení mechanických vlastností scaffoldu.

Kromě velikosti pórů ovlivňuje vznik tkáně také jejich geometrie (neměly by být příliš dlouhé ani zakřivené). Pokud se ve struktuře vyskytují například trojúhelníkové póry, nejprve dochází k růstu nové tkáně v rozích. Po určité době dojde k zakulacení počáteční geometrie a poté roste tkáň stejnoměrně ve všech místech póru. Na obr. 15 si lze tedy všimnout, že nezávisí na počáteční geometrii póru, ale vždy dojde nejprve k zakulacení rostoucí tkáně. [41]

Důležitým požadavkem na strukturu materiálu scaffoldu je i vzájemná propojenost jednotlivých pórů. Musí mít dostatečnou velikost na to, aby umožnili průchod jádra buňky, aniž by došlo k jeho poškození. [41]



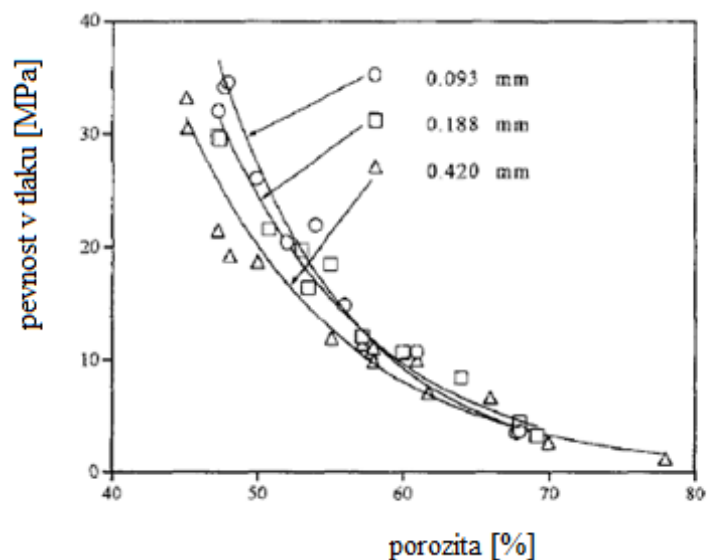
Obr. 15 a) Tkáň zvýrazněná zelenou barvou znázorňuje dominantní růst v oblastech s větší křivostí, b) Matematický model popisující předpokládaný růst tkáně [41]

### 3.3.2 Vliv porozity na mechanické vlastnosti

Vysoká porozita materiálu je sice vyžadována, ale biokeramické látky s vysokou porézností vykazují velký pokles mechanické pevnosti v tlaku (klesá přibližně exponenciálně).

Další důležitou mechanickou vlastností je lomová houževnatost. Její hodnota u HA biokeramiky nepřesahuje 1,2  $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ . Lidská houbovitá kost dosahuje hodnoty 2  $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$  a kost hutná 12  $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ . Rozdíl způsobuje chybějící kolagen v uměle vyrobeném materiálu (kolagen tvoří až 90 % organické části matrixu u lidské kosti). [42]





Obr. 16 Vliv velikosti pórů a celkové porozity na pevnost v tlaku [43]

### 3.4 Bioaktivní keramické pěny

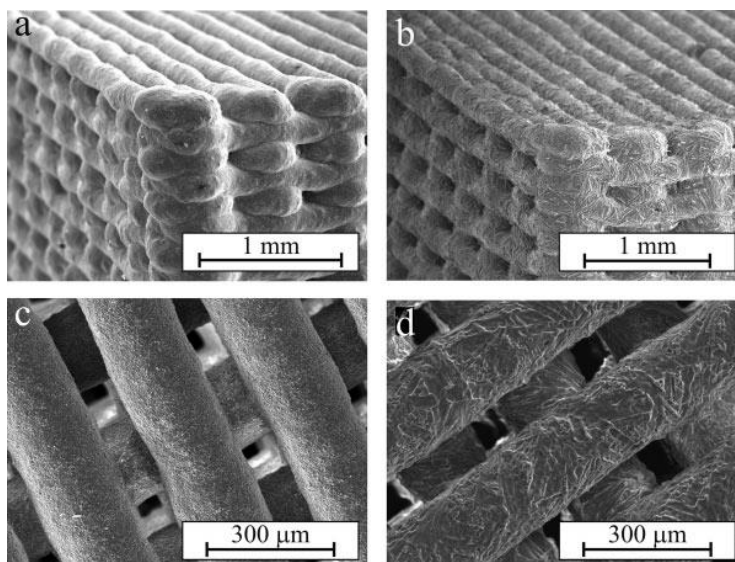
Základní stavební jednotkou keramických pěn je buňka. Jednotlivé buňky se skládají z póru a materiálu, ze kterého je tvořena nosná konstrukce pěny. Největší úspěchy při popisování mechanických vlastností pěn se začaly objevovat v 60. a 70. letech. Od této doby vedlo další zkoumání ke komplexnějšímu pochopení vlastností pěny. [44]

Příkladem bioaktivní keramické pěny jsou hydroxyapatitové pěny určené pro výrobu kostních scaffoldů. Pěny byly zhotoveny metodou přímého napěnění suspence hydroxyapatitu na bázi vody s rozpuštěnou epoxidovou pryskyřicí. Byl zkoumán vliv podmínek zpracování na výslednou strukturu. Jako nejlepší byla vybrána pěna se 78% otevřenou pórovitostí, velikostí pórů 430  $\mu\text{m}$  a propojeností pórů o velikosti 150  $\mu\text{m}$ . Pevnost v tlaku dosáhla hodnoty 3,3 MPa. [45]



Obr. 17 Defekt modelu dolní čelisti člověka vyplněný hydroxyapatitovým scaffoldem [45]

Jiným způsobem výroby keramické pěny je robocasting. V článku [46] jsou popisovány vlastnosti scaffoldu z HA a  $\beta$ -TCP zhotovených touto metodou. U vytvořených porézních struktur byla hodnocena pevnost v tlaku a analyzován účinek třítýdenního ponoření do simulované tělesné tekutiny. Dospělo se k závěrům, že zhotovené struktury vykazují dobré mechanické vlastnosti, což slibuje velký potenciál pro využití těchto scaffoldů k regeneraci kostní tkáně.



*Obr. 18 Morfologie HA (vlevo) a  $\beta$ -TCP (vpravo) scaffoldu:  
a), b) celkový pohled, c), d) pohled na rovinu tisku [46]*

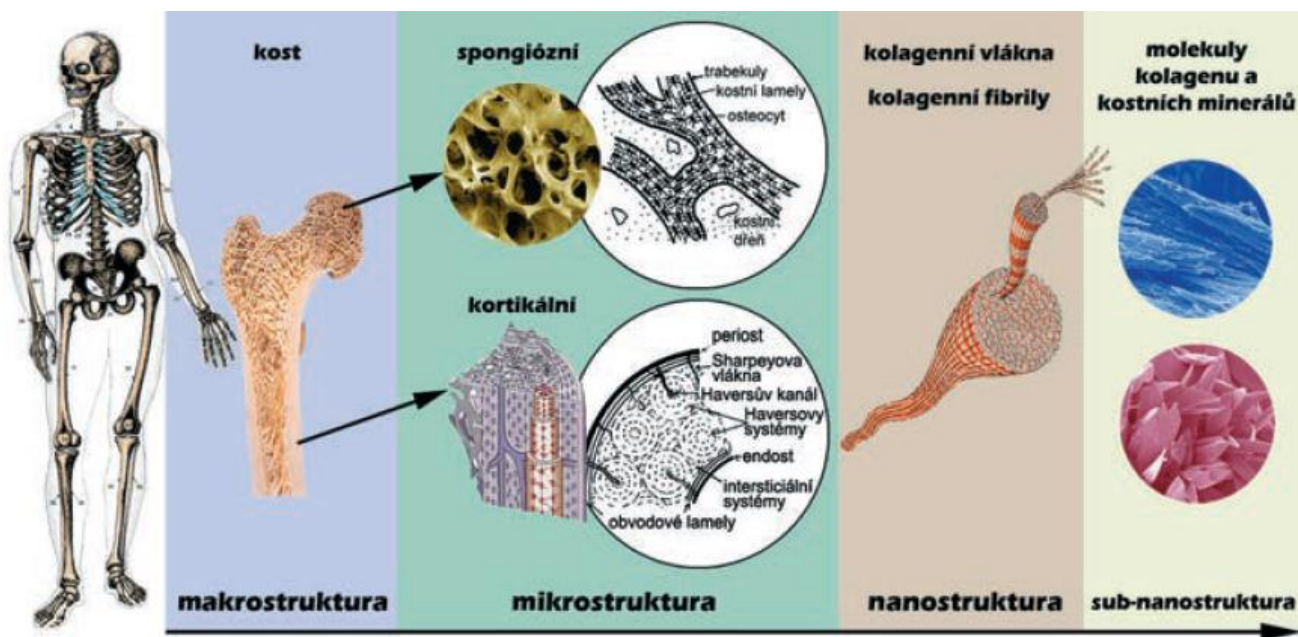
## 4 Biologie kostí a interakce kostní tkáně s fosforečnanovými keramikami

Kostra je souborem všech kostí a představuje základ pro stavbu lidského těla. Plní zejména podpůrnou roli, která dává organismu tvar, umožňuje pohyb, poskytuje oporu měkkým tkáním a chrání důležité orgány. Mezi další funkce kostry lze zařadit také produkci červených krvinek a uchovávání minerálů, které jsou v případě potřeby uvolňovány, aby se neměnilo iontové složení tělních tekutin.

Kosti jsou díky své struktuře pevné, tvrdé a v jistém rozmezí i pružné orgány. Proces vzniku kostí se označuje jako kostnatění (osifikace) a jedná se o přeměnu vaziva nebo chrupavky na kost.

Kostní tkáň se liší od ostatních pojivových tkání především přítomností velkého množství anorganických látek v základní hmotě. Jedná se o kompozitní materiál. Tkáň obsahuje 60 hm. % minerální složky (hlavně na bázi fosforečnanu vápenatého a hydroxyapatitu), 30 hm. % organické složky (ta je asi z 90% tvořena kolagenem) a zbylých 10 hm. % vody. [47]

Z makroskopického hlediska lze rozlišit dva typy kostní tkáně: kompaktní (kortikální, hutnou) nebo houbovitou (spongiózní). Kompaktní tkáň se nachází na povrchu kosti a skládá se z jednotlivých vrstev – lamel. Tyto lamely jsou uspořádány do válcovitých útvarů a mezi nimi se nachází osteocyty. Houbovitá kostní tkáň se nachází uvnitř kosti. [48]



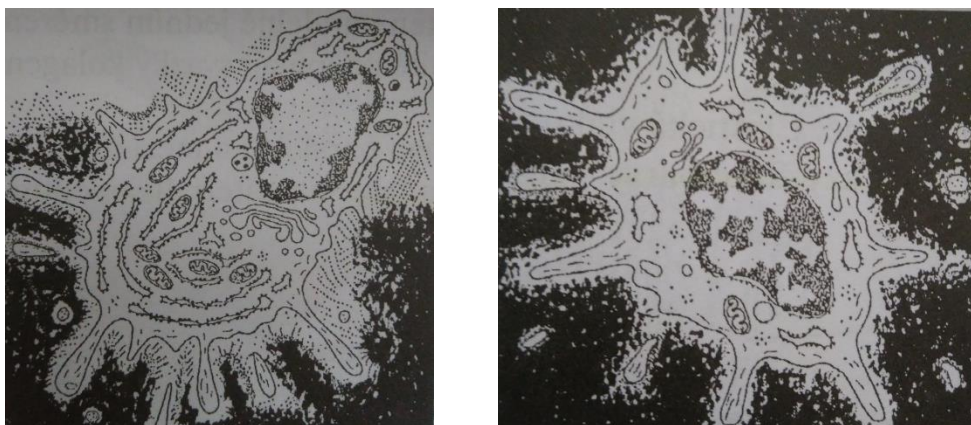
Obr. 19 Struktura lidské kosti [49]

## 4.1 Složení kosti

Kostní tkáň představuje vysoce diferencovaný typ pojiva vyznačující se pevností a tvrdostí. Stejně jako ostatní pojiva se skládá z buněk a mezibuněčné hmoty (zvané kostní matrix), která obsahuje vysoký podíl anorganických látek. Krystaly minerálních složek představují zpevňující fázi kompozitu a jsou vázány na kolagenová vlákna, která jsou flexibilní a velmi houževnatá. [47]

V kostní tkáni rozlišujeme 4 typy buněk: osteoblasty, osteocyty, osteoklasty a tzv. buňky lemující kost (lining cells). Buňky osteoblasty zahajují proces osifikace. Jsou to nezralé buňky, jejich předchůdcem jsou osteoprogenitorové buňky. Mají nepravidelný tvar s výběžky. Vyznačují se sekreční funkcí. Zodpovídají za produkci organických částí kostní matrix (kolagenu, proteoglykanů a glykoproteinů). Vyskytují se na povrchu kosti v jedné vrstvě. [48]

Jakmile jsou osteoblasty obklopeny vyprodukovanou mezibuněčnou hmotou, postupně se začnou měnit ve zralé kostní buňky, osteocyty. Tvoří 90% všech kostních buněk. Mají vřetenovitý tvar a jsou spojeny výběžky, pomocí kterých se udržuje látková výměna. Osteocyty již nevytváří novou kostní hmotu, ale podílejí se na uvolňování minerálů ze základní hmoty (tím se reguluje hladina vápníku v tělních tekutinách). [49]



*Obr. 20 a) osteoblast, b) osteocyt [49]*

Lining cells jsou protáhlé zploštělé buňky. Jedná se o klidovou formu osteoblastů, které ukončily svoji sekreční aktivitu. Vyskytují se na povrchu kostí, kde zrovna neprobíhá přestavba ani vznik nové tkáně. Vytvářejí iontovou bariéru mezi extracelulární a intersticiální tekutinou. Nacházejí se v těsné blízkosti osteoblastů, s nimiž jsou propojeny buněčnými spoji. [49]

Pro přestavbu kostí jsou důležité obrovské mnohоядерné buňky, osteoklasty, které naopak primární kostní tkáň odbourávají, protože produkují kyselou fosfatázu a kolagenázu. Osteoklasty mají složitou strukturu povrchu, která výrazně zvětšuje resorpční povrch buňky. V místě, kde naléhají na odbourávanou kost, cytoplazmatická membrána vybíhá v nepravidelné výběžky (tzv. třásňový lem). Odbouraná kost je nahrazena kostí novou. [49]



*Obr. 21 Osteoklast [49]*

## 4.2 Reparace (hojení) kostí

Kost se navenek jeví jako inertní tkáň, ale přesto má velmi bohatý metabolismus a schopnost přestavby po celý život jedince. Umožňuje tělu adaptaci na určitou mechanickou zátěž a hojení stávajících poškození.

Kostní resorpce a tvorba jsou neoddělitelné procesy. Osteoklasty zodpovídají za kostní resorpci a osteoblasty za tvorbu organické matrix. Pokud se jedná o zdravý organismus, kostní resorpce a tvorba nové kostní tkáně jsou v rovnováze. Kostní hmota tedy zůstává konstantní. [48]

Přestavba kostní tkáně probíhá v tzv. remodelačním cyklu. Dochází při něm ke vzájemné kooperaci kostních buněk v útvaru označovaném jako základní multicelulární jednotka (BMU). Stavební procesy obvykle trvají delší dobu, než jaká je životnost jednotlivých buněk BMU, proto zanikající složky musí být průběžně nahrazovány novými. [48]

Regenerace kostí se uplatňuje i při hojení kostních zlomenin (fraktur). Zlomenina je porucha kontinuity kosti. Nastane v okamžiku, kdy na kost působí síla překračující její pevnost a pružnost. Vzniká mechanismem přímým (síla působí v místě zlomu) nebo nepřímým (dochází k působení sil v oblasti více vzdálené od zlomeniny). Zlomeniny lze rozdělit podle různých kritérií, proto se v lékařství zavedla tzv. AO klasifikace zlomenin (klasifikace dle Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen, tj. Pracovního spolku pro otázky osteosyntézy). [50]

## 4.3 Popis procesu hojení

Zlomenina kosti je obvykle doprovázena poškozením okolní tkáně a krvácením z poraněných cév. Prostor mezi jednotlivými fragmenty postupně zaplňuje prosakující krev a vzniká krevní výron (hematom). Z buněk stěn porušených cév se v hematomu postupně diferencují vazivové buňky (fibroblasty), které produkují základní amorfni mezibuněčnou hmotu a vazivová vlákna, a vytvoří se tzv. vazivový svalek. [48, 49]

V bohatě prokrveném vazivovém svalku se z fibroblastů diferencují chrupavčité buňky (chondroblasty) a vzniká chrupavčitý svalek. Dochází k nárůstu počtu osteoblastů. Vytváří



mezibuněčnou hmotu z kolagenu a polysacharidů, ve kterých se později usazují vápenaté ionty a vytvoří se kostěný svalek. Tato tvrdá skořápka poskytuje potřebnou ochranu a stabilitu pro závěrečnou fázi hojení. [48, 49]

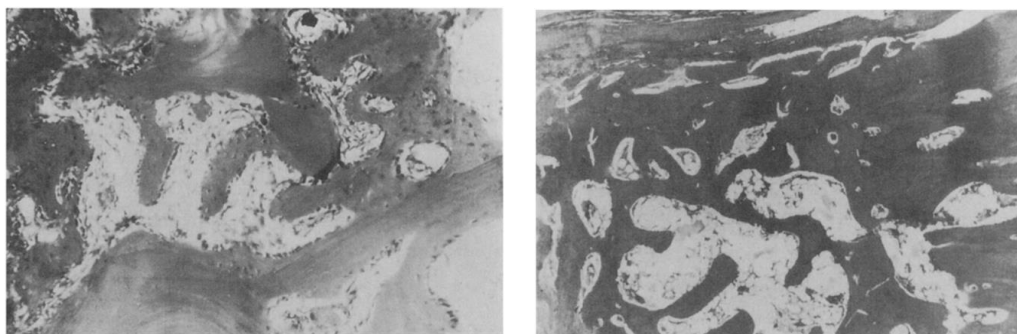
Kostní svalek je zpočátku tvořen houbovitou (spongiózní) kostí. Trámce této kosti jsou však málo odolné proti zatížení, a proto musejí osteoblasty a osteoklasty přemodelovat strukturu na pevnou lamelární kost. Zároveň dochází k obnovování celkové kostní stavby. V kosti vznikají například kanálky (osteony), kudy mohou procházet cévy a nervy. [48]

Kromě přirozeného (sekundárního) hojení zlomenin lze odstranit poškození kosti také pomocí dlah a šroubů (primární hojení). Při stabilní fixaci konců fraktury a rozestupu do 1 mm vzniká v její šterbině přímo bez jakýchkoliv mezikroků lamelární kost. [48]

#### 4.4 Kostní štěpy

K náhradě kostních defektů nebo i celých částí kosti se využívají kostní štěpy. Jedná se o transplantaci živé kosti z jednoho místa na jiné. Transplantace popisuje přenos živých buněk, zatímco implantace se týká neživých. Kostní štěpy musí vykazovat alespoň jednu z uvedených funkcí: osteogeneze, osteokondukce nebo osteoindukce. Osteogeneze je definována jako proces tvorby nové kosti a nastává, pokud jsou ve štěpu transplantovány životaschopné osteoblasty nebo kmenové buňky. Rozlišujeme autogenní a allogenní transplantáty. [52]

Autogenní transplantáty jsou odebrané z těla téhož pacienta. Kostní tkáň se nejčastěji získává z pánevní kosti. Její množství závisí na typu a velikosti defektu. Výhodou těchto štěpů je vysoká biologická aktivita, rychlá integrace a možnost revaskularizace. Nevýhodou je možnost odebrat pouze omezené množství štěpů. Jak můžeme vidět v [52], léčba pomocí autogenních kostních štěpů je rozdělena do rané a pozdní fáze. Počáteční fáze (první 4 týdny) je charakterizována výskytem zánětu, revaskularizací a osteoindukcí. V pozdní fázi dochází k osteokondukci a popřípadě začlenění štěpu. Dochází k přestavbě, dokud štěp není zcela nahrazen hostitelskou kostí (trvá obvykle asi 1 rok).



*Obr. 22 a) 2 týdny po transplantaci, b) 1 rok po transplantaci [52]*

Allogenní transplantáty jsou odebrané části kostní tkáně od jiné osoby. Využívají se v případech, kdy není možné odebrat pacientovi vlastní tkáň vůbec nebo jen nedostatečné množství. Čerstvé a čerstvě zmrazené kostní allogenní transplantáty mohou vyvolat větší imunitní odpověď, demineralizované kosti vykazují nižší antigenicitu a klinické odmítnutí je vzácné. [52]

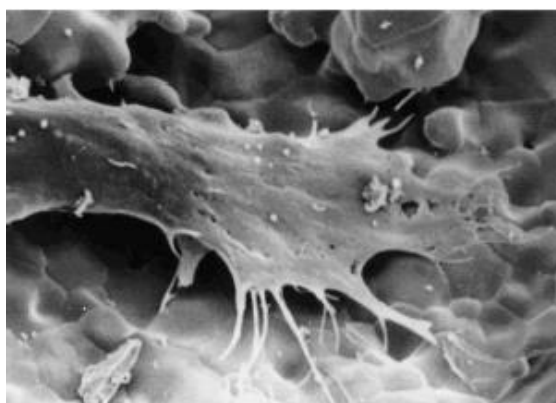
V současné době se upřednostňují autogenní kostní štěpy. Největší nevýhodou při jejich používání je značná devastace dárcovského místa a omezená dostupnost. Stejně jako

autogenní také allogenní transplantáty představují riziko přenosu nemocí nebo imunitního odmítnutí. Obavy z používání těchto typů štěpů vedly k rozvoji syntetických náhrad. Mezi nejslibnější náhrady je řazen hydroxyapatit (HA) a fosforečnan vápenatý (TCP) nebo jejich kombinace. Důvodem je jejich podobnost s anorganickou složkou kosti a dobré biologické vlastnosti. Nelze je však použít v nosných oblastech, protože nevykazují dostatečné mechanické vlastnosti. [52]

#### 4.5 Interakce keramiky s kostní tkání

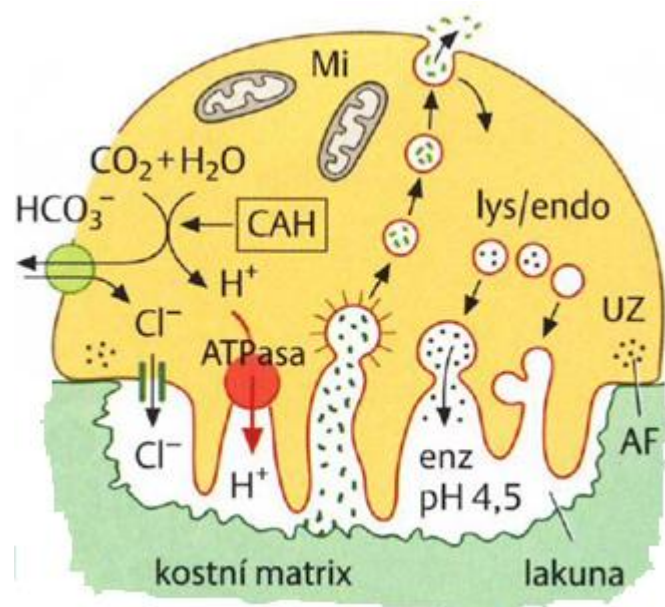
Při používání biokeramických náhrad k regeneraci kostí dochází k interakci mezi implantátem a buňkami tkáně. Buněčná odezva na biomateriál (jako je proliferace a diferenciací buněk) závisí nejen na povrchové morfologii, ale také na chemickém složení materiálu. [53]

Jak Hench uvádí ve své knize [37], typ spojení kost-implantát závisí na povaze použitého materiálu. Síla působící na mezifázovém rozhraní je mnohem vyšší u bioaktivních materiálů než například u kovových implantátů. Při použití bioaktivního materiálu snáze dojde k porušení samotného materiálu nebo kosti než k zániku jejich spojení. V případě bioinertního materiálu by došlo k oddělení právě ve spojované oblasti.



*Obr. 23 Lidská kostní buňka rostoucí na povrchu HA keramické pěny [29]*

Obr. 24 zobrazuje činnost osteoklastu při resorpci. Během resorpčního cyklu se osteoklasty připojí k povrchu kosti a rozkládají organickou i anorganickou matrix, poté se odtrhnou a přemístí na jinou resorpční plochu či odumřou. Aktivní osteoklasty vytváří na ploše přiléhající k povrchu kosti zřasený okraj, čímž je zvětšen povrch cytoplasmatické membrány. V membráně je obsažena ATPáza, která svou činností okyseluje prostor resorpční lakuny. Tento prostor, v němž hodnota pH dosahuje asi 4,5, je oddělen od okolí. Při výrazně sníženém pH dochází k odbourávání anorganické části kosti, poté je vlivem enzymů odbourávána část organická. Nejvýznamnějšími enzymy jsou matrixové metaloproteinázy (MMP, zejména kolagenáza) a lyzozomální cysteinové proteinázy (katepsiny). [48]



Obr. 24 Schéma činnosti osteoklastu [48]



## 5 Směsné fosforečnanové keramiky

V roce 1920 představil Albee první úspěšnou aplikaci fosforečnanu vápenatého, který byl použitý na opravu defektu lidské kosti. [54] Ke klinickému využití však došlo až o více než 50 let později. Jednalo se o nápravu chirurgicky vytvořených defektů u zvířat [55] a použití hydroxyapatitu pro nahrazení zubních kořenů. [56] Až na počátku 80. let se syntetický HA a  $\beta$ -TCP staly komerčně dostupnými jako materiály pro náhrady používané v zubním lékařství. [57]

### 5.1 Materiály pro výrobu scaffoldů

Za nejvhodnější syntetický materiál pro náhradu kostní tkáně se považuje materiál na bázi fosforečnanu vápenatého. Mezi nejpoužívanější patří hydroxyapatit (HA) a dva typy fosforečnanu vápenatého ( $\alpha$ -TCP a  $\beta$ -TCP).

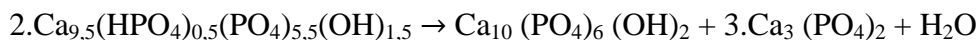
Kromě čistých látek se v lékařské praxi používají také jejich směsi. Dvoufázové směsi se označují jako BCP (biphasic calcium phosphate) a jedná se o směsi HA +  $\alpha$ -TCP, HA +  $\beta$ -TCP nebo dvojfázový TCP (složený z  $\alpha$ -TCP a  $\beta$ -TCP). Kromě dvoufázových směsí se můžeme setkat také s trojfázovou keramikou skládající se z HA+ $\alpha$ -TCP+ $\beta$ -TCP. [58]

Termín "dvoufázový fosforečnan vápenatý" (BCP) se poprvé objevil v roce 1985 ve dvou prezentacích na 11. výročním zasedání Společnosti pro biomateriály. Nery a kol. [59] tento termín použil k popisu biokeramiky, která byla tvořena směsí HA a  $\beta$ -TCP. Materiál byl původně označen jako fosforečnan vápenatý, ale za použití rentgenové difrakce (XRD) bylo dokázáno, že se jedná o směs tvořenou 80 % HA a 20 %  $\beta$ -TCP. [60]

#### 5.1.1 Příprava směsných fosforečnanů vápenatých

Nejběžnějším způsobem, jak připravit vícefázový fosforečnan vápenatý, je slinování jeho nestechiometrické formy (jako jsou amorfní fosforečnan vápenatý (ACP) a CDHA) nad teplotou 750 °C. Často se provádí i slinování při teplotách nad 1000 °C. [61, 62]

Například rovnice tepelného rozkladu  $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}(\text{CDHA})$  pro  $x = 0,5$  vypadá následujícím způsobem:



Tento rozklad vede k vytvoření BCP složeného z HA a  $\beta$ -TCP. Strukturu výsledného materiálu lze vidět na obr. 25. Typ získaného BCP závisí na teplotě slinování. Pokud tato teplota nepřekročí 1200 °C, je připraven BCP o složení HA+  $\beta$ -TCP. Pokud se však teploty při slinování blíží 1300 °C nebo tuto hodnotu přesáhnou, lze připravit BCP se složením HA +  $\alpha$ -TCP +  $\beta$ -TCP. Podmínky syntézy nestechiometrického  $\text{CaPO}_4$  mají vliv na poměr HA/TCP ve výsledné struktuře BCP.



*Obr. 25 Struktura BCP (60HA/40β-TCP) získaná slinováním při teplotě 1050 °C [58]*

Pokud vytvořenou strukturu BCP (HA+ β-TCP) dále slinujeme při teplotách vyšších než 1200 °C, β-TCP se částečně transformuje na α-TCP a vzniká třífázový CaPO<sub>4</sub>. [63] Experimentální výsledky jiné studie třífázových směsí ukazují, že teplota slinování pro fázovou přeměnu β-TCP na α-TCP roste s rostoucím obsahem HA ve struktuře. [64]

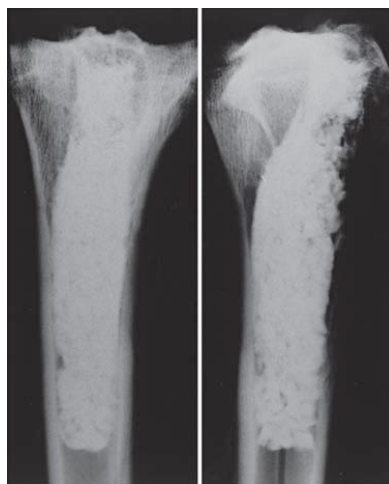
Vícefázový CaPO<sub>4</sub> může být připraven také mechanickým promícháním jednotlivých prášků fosforečnanu vápenatého. Jako příklad tohoto způsobu výroby je v článku [58] uvedeno mechanické smíchání dvou různých typů prášku CDHA, CDHA s x = 0,9 (téměř TCP) a CDHA s x = 0,1 (téměř HA), a následné slinutí celé směsi. V prvním případě se CDHA rozloží na β-TCP s malou příměsí HA, zatímco ve druhém případě vznikne HA s malou příměsí β-TCP, což vede ke vzniku BCP se složením HA+ β-TCP.

Mechanické míchání se však nedoporučuje pro výrobu vícefázové keramiky s reprodukovatelným poměrem komponent a homogenním rozmístěním krystalů. BCP keramiky vytvořené tímto způsobem vykazovaly vyšší rozpustnost a horší schopnost slinování než keramiky připravené tepelným rozkladem jedné fáze CDHA se stejným poměrem HA/ β-TCP.

### **5.1.2 Vliv fázového složení na bioaktivitu**

HA je přirozenou anorganickou složkou lidské kosti. Implantáty vyrobené z HA nevyvolávají v těle pacientů žádné zánětlivé reakce. Tento typ keramiky se vyznačuje dobrou biokompatibilitou a osteokonduktivitou, což umožňuje uchycení implantátu na určeném místě a následně růst nové tkáně. Nevýhodou je však špatná rozpustnost, kvůli které není vhodným materiálem pro výrobu vstřebatelných kostních implantátů.

Na obr. 26 je znázorněno použití HA granulí pro zaplnění dutiny ve zvířecí holenní kosti. 18 měsíců po implantaci bylo zvíře utraceno a byly pořízeny rentgenové snímky. Malé prostory mezi jednotlivými HA granulemi a kostí zmizely během 3 měsíců po operaci. Důvodem byl růst nové tkáně v prázdných dutinách. Granule však byly po operaci příliš stabilní a nedošlo k požadovaným morfologickým změnám a snížení objemu implantovaného materiálu. Nová kostní tkáň nepronikla do celého objemu keramické náhrady. [15]



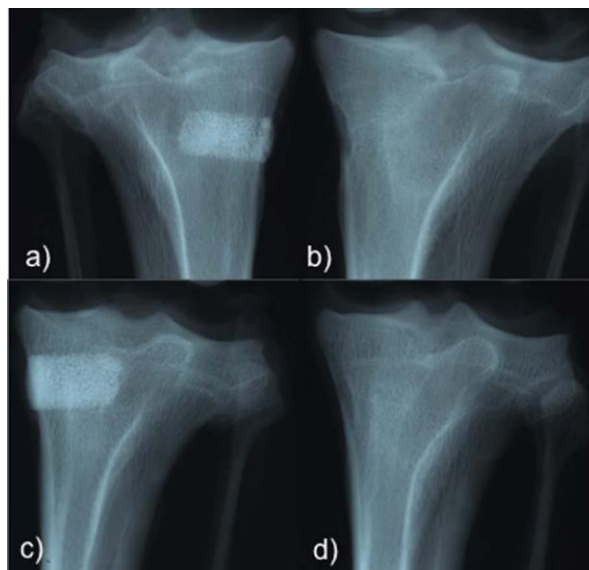
*Obr. 26 RTG snímek vyplněné části zvířecí kosti HA granulemi [15]*

Použití granulí z  $\beta$ -TCP lze vidět na obr. 27. Byly implantovány do stehenních kostí opic a zafixovány destičkou, aby bylo dosaženo dostatečné pevnosti a zvířata se mohla volně pohybovat. Studie ukázala, že průměrně již po 12 týdnech byla vstřebána převážná část implantátu. [65]



*Obr. 27 RTG snímek po 10 týdnech od operace, kdy byl TCP implantát téměř vstřebán, ale v dané době nebylo dosaženo dostatečné regenerace kosti [65]*

Při srovnání jednotlivých implantátů lze říci, že HA je na rozdíl od  $\beta$ -TCP z fyziologického hlediska stabilnější. U HA implantátu sice došlo k vytvoření vazby s tkání a uchycení implantátu, ale nedošlo k prorostení tkáně do celého objemu náhrady. Implantáty z  $\beta$ -TCP vykazují mnohem lepší vstřebatelnost, což má velkou výhodu oproti použití HA implantátů. Další srovnání biodegradability těchto dvou materiálů znázorňuje obr. 28. [64]



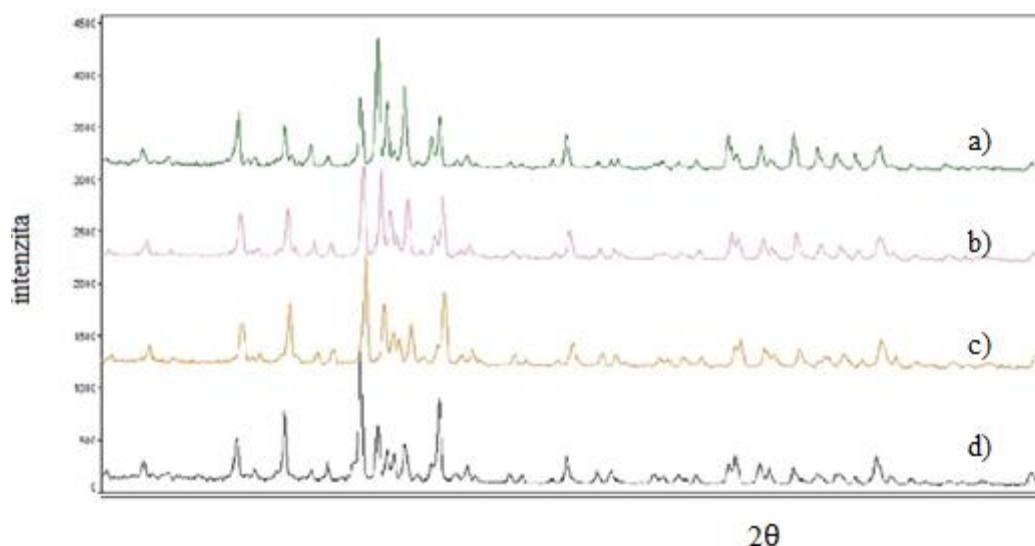
*Obr. 28 a) HA scaffold po 5 měsících od transplantace, b) téměř úplná resorpce TCP scaffoldu po 6 měsících, c) HA scaffold po 15 měsících, d) úplná resorpce TCP scaffoldu po 15 měsících [66]*

Jednotlivé druhy keramiky se liší rychlostí vstřebávání implantátu, proto při návrhu složení BCP je důležité najít správnou rovnováhu mezi stabilnějším HA a rozpustnějším TCP. S rostoucím poměrem TCP/HA ve struktuře se zvyšuje reaktivita BCT a tím je možné ovlivnit rychlost resorpce implantátu. Podobné poznatky platí i pro dvoufázovou TCP směs, kde je za rozpustnější složku považován  $\alpha$ -TCP.

## 5.2 Vlastnosti BCP

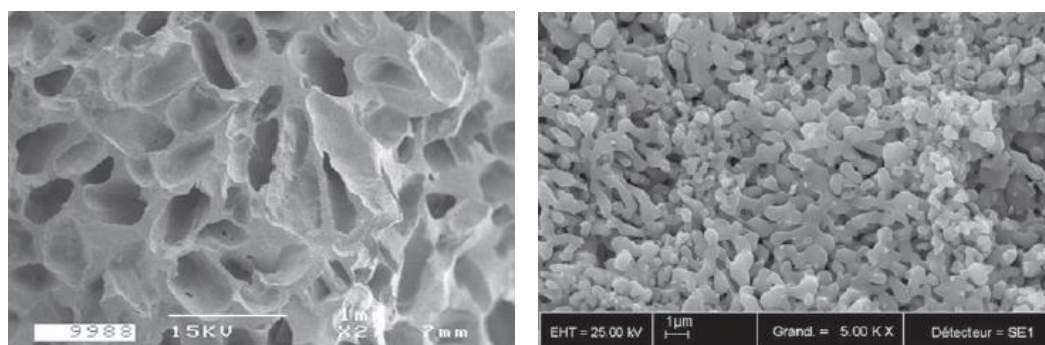
Obecně platí, že hlavní mechanické, fyzikální a chemické vlastnosti dvoufázové keramiky na bázi fosforečnanu vápenatého jsou podobné jednofázové keramice připravené z HA,  $\alpha$ -TCP a  $\beta$ -TCP. Vlastnosti výsledného BCP závisí na relativním množství těchto komponent. Hlavní rozdíly mezi jednotlivými typy keramik souvisejí především s bioresorpčním chováním těchto materiálů. [67]

Nejběžnější metodou pro charakterizaci BCP je rentgenová difrakce (XRD). XRD se používá pro identifikaci fází a kvantifikaci biokeramických materiálů za použití rentgenového záření. Jako jediná technika poskytuje průměrnou aproximaci poměru HA/ $\beta$ -TCP v materiálu. [68]



*Obr. 29 XRD snímek BCP scaffoldu s rozdílným poměrem HA/β-TCP: a) 50/50, b) 40/60, c) 30/70 a d) 20/80 [68]*

Důležitými vlastnostmi pro správné biologické fungování biokeramiky je makroporozita a mikroporozita. Makroporozity u BCP keramiky se dosahuje použitím metod popsanych v předchozí kapitole. Mikroporozita je ovlivěna teplotou a dobou trvání slinování. [15]



*Obr. 30 BCP keramika: a) makroporozita, b) mikroporozita [15]*

### 5.3 Optimální složení BCP

Na povrchu BCP implantátu se objevují krystalky CDHA. Jejich množství je ovlivněno poměrem HA/β-TCP. Čím je poměr nižší, tím více krystalů se na povrchu vyskytuje. Ovlivňují biologickou aktivitu BCP implantátu, proto bylo testováno různé složení HA/β-TCP, aby bylo dosaženo požadovaných biologických vlastností. Ideální rovnováha mezi těmito dvěma fázemi může zlepšit mechanickou pevnost a zlepšit biologické chování scaffoldu. [69]

Studie ukazují, že díky změně poměru jednotlivých fází, lze řídit biologickou aktivitu vytvořené keramiky. Určité vlastnosti BCP však nemusí být charakteristické pouze pro jeden konkrétní poměr HA/β-TCP, ale spíše platí pro rozsah blízkých poměrů. Například při srovnání s poměrem 20/80, podobné výsledky byly zjištěny i u poměrů 15/85, 25/75 a 30/70.

Dalším důležitým poznatkem je objev, že při poměru 50/50 a 60/40 dochází k mnohem vyšší proliferaci buněk.

V současné době neexistuje žádná obecná shoda ohledně ideálního poměru jednotlivých fází na výrobu BCP pro klinické aplikace. Existují různé poměry HA/ $\beta$ -TCP, které byly zkoumány a hodnoceny. Nicméně pouze BCP s poměry 65/35, 60/40 a 50/50 byly úspěšně použity v lidské medicíně. [70, 71] Některé osteoinduktivní vlastnosti však byly pozorovány také u poměrů 30/70 a 20/80. [72] Proto lze říci, že vztah mezi složením BCP a buněčným chováním je složitější a vyžaduje další zkoumání.

## 5.4 Biomedicínské využití

Dvoufázový fosforečnan vápenatý se k medicínským účelům začal využívat v roce 1986. V současné době by podle článku [73] bylo možné využívat také třífázovou keramiku, ale komerčně jsou vyráběny pouze dvoufázové varianty. Obsahují různý poměr HA/TCP. Prodávají se ve formě bloků, granulí nebo speciálních tvarů. Slouží jako náhrada kostních štěpů nebo jako implantáty v ortopedii a stomatologii.

Studie zabývající se bioaktivní keramikou ukázaly, že implantáty z BCP (HA+  $\beta$ -TCP) mají lepší osteoinduktivní vlastnosti než čistý HA nebo  $\beta$ -TCP a občas dokonce i než samotné kostní štěpy [74], nedosahují pouze vlastností čistého  $\alpha$ -TCP cementu.

Využití vícefázového fosforečnanu vápenatého představuje velký potenciál pro různé biomedicínské aplikace. Nicméně většina in vivo aplikací je zatím omezena pouze na testování BCP keramiky na zvířatech. Na obr. 31 je znázorněno použití BCP implantátu (65% HA + 35%  $\beta$ -TCP) k léčbě kostního defektu vytvořeného ve stehenní kosti králíka. Došlo k významnému přírůstku kostní hmoty na minimálně čtyřnásobek objemu aplikované biokeramické látky. [75]



*Obr. 31 Rentgenové snímky stehenní kosti králíka  
a) před a b) po aplikaci BCP implantátu a stabilizaci [76]*

## 5.5 Dostupné komerční produkty

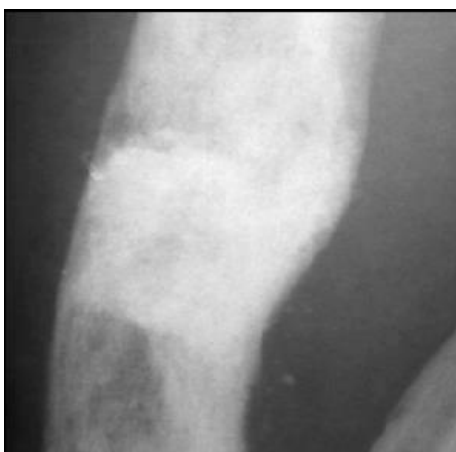
V současné době se v lékařství používají BCP produkty s různými nebo podobnými poměry HA/ $\beta$ -TCP. Celková porozita obvykle tvoří asi 70% objemu biokeramického materiálu. Poměr HA/ $\beta$ -TCP se pohybuje v poměrně širokém rozpětí a příklady komerčních produktů jsou uvedeny v tab. 1. [77]

Pro uvedené směsi makroporozita představuje 50-60%, ale procento mikroporozity se u jednotlivých případů značně liší (3-25%). Nízké procento mikroporozity a nízká plocha povrchu mohou mít za následek nižší bioaktivitu a nižší schopnost rozpouštění. Ideální velikost pórů u biokeramického materiálu by měla odpovídat velikosti pórů kosti.

Tab. 1 Komerčně vyráběná BCP keramika [77]

HA %	TCP %	Název značky produktu
80	20	Osteosynt (Einco, Brazílie)
75	25	TCH (Kasios, Francie)
70	30	Ceratite (NGK Spark Plug, Japonsko)
65	35	Ceraform (Teknimed, Francie)
60	40	BCP (Depuy Bioland, Francie)
60	40	BonaGraft (Biotech One, Taiwan)
60	40	4Bone (MIS, Izrael)
55	45	Eurocer (FH, Francie)
20	80	ReproBone (Ceramisys, UK)
20	80	Kainos (Signus, Německo)
20	80	BoneCeramic (Straumann, Švýcarsko)

Na obr. 32 je znázorněno použití BCP skládající se z 80% HA a 20% TCP (Osteosynt). Jednalo se o nápravu defektu lidské holenní kosti. Keramika byla implantována ve formě granulí. [78]



Obr. 32 Rentgenový snímek BCP implantátu v holenní kosti

## 5.6 Další možné zlepšení bioaktivity porézních BCP

Kost je přírodní kompozitní materiál složený z minerální fáze (zejména hydroxyapatitu) a organické fáze (kolagenu). Hydroxyapatit představuje zpevňující složku kosti, zatímco kolagenová vlákna jsou zodpovědná za houževnatost.

Cílem při vývoji materiálů určených pro nahrazení kostní tkáně je dosáhnout takové struktury, která vykazuje co nejpodobnější vlastnosti jako samotná kost. Do struktury scaffoldů se kromě keramické složky (fosforečnanu vápenatého) začleňují také polymerní látky (kolagen, chitosan, polyfosforečnan a biosilika).

Používání polymerů jako biomateriálů je známo již dlouhou dobu. Přírodní polymery vznikají v rostlinných i v živočišných organismech. Jejich složení je velmi podobné a v některých případech se může dokonce i shodovat s tkáněmi lidského organismu. Z tohoto důvodu je organismus schopen tyto materiály rozpoznat a zpracovat.

Polymerní látky zvětšují povrch vhodný pro uchycení buněk, díky své antibakteriální povaze zabraňují vzniku zánětů, podporují aktivitu buněk potřebných pro tvorbu kostní tkáně a uvolňují látky důležité pro mineralizaci kosti.

### 5.6.1 Chitosan

Chitosan patří mezi přírodní polysacharidové polymery. Jedná se o derivát chitinu, což je po celulóse druhý nejrozšířenější polysacharid, a je jedním z nejdůležitějších polymerů na světě. V přírodě se nejvíce vyskytuje v kutikulách mořských korýšů. Komerčně se dosud chitin a chitosan získávají například z krabů a krevet.

Chitosan je tvořený jednotkami N-acetyl-glukosaminu a N-glukosaminu. Pokud je počet N-acetyl-glukosaminových jednotek vyšší než 50 %, jedná se o chitin. V opačném případě jsou látky souhrnně nazývány chitosan.

Chitosan má vynikající biologické vlastnosti. Je netoxický, biokompatibilní a biodegradabilní. Používá se kvůli svým antibakteriálním účinkům nebo jako systém pro řízené uvolňování léčiva. [79]

Ve své krystalické formě je za normálních podmínek při neutrálním pH nerozpustný ve vodných rozpouštědlech. V kyselém prostředí díky své kationtové povaze na sebe váže aniontové molekuly a rozpouští se.

Při tvorbě kompozitních scaffoldů s chitosanem se lze setkat se dvěma možnostmi. V prvním případě lze z chitosanu vytvořit porézní síť, která vyplní póry fosforečnanového scaffoldu. Druhou možností je vytvoření scaffoldu z chitosanu, kde se fosforečnanová keramika vyskytuje ve formě částic. V obou případech dochází ke zlepšení mechanických vlastností scaffoldu. Kombinace chitosanu s fosforečnanovou keramikou má pozitivní vliv na proliferaci buněk. [79, 80]

### 5.6.2 Kolagen

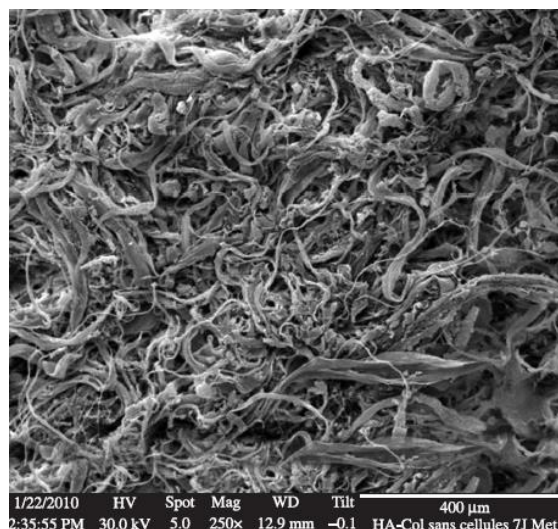
Kolagen je ve vodě nerozpustná látka bílkovinné povahy. Tvoří základní stavební hmotu pojivových tkání (vazivo, chrupavka, kost). Představuje složku mezibuněčné hmoty ve formě kolagenových vláken. Vlákna jsou velmi ohebná a pevná na tah.

V současnosti je známo nejméně 28 rozdílných typů kolagenů. V lidském těle jsou však nejrozšířenější především 3 základní typy. Kolagen typu I je nejrozšířenějším kolagenem v organismech. Nachází se v kůži, šlachách, kostech, rohovce, plicích a cévách. Fibrily tvoří



silná vlákna a svazky vláken, které lze vidět i pouhým okem. Výskyt kolagenu typu II je omezen pouze na chrupavku. Typ III se nachází v poměrně elastických tkáních (například cévy, pokožka embrya a plíce).

Při spojení kolagenu se scaffoldem z fosforečnanu vápenatého dochází ke zvýšení počtu míst pro uchycení buněk, zatímco keramický materiál představuje zásobárnu látek potřebných k vytvoření pevné kosti. Kolagen díky své houževnatosti vylepšuje mechanické vlastnosti fosforečnanových scaffoldů. [81]

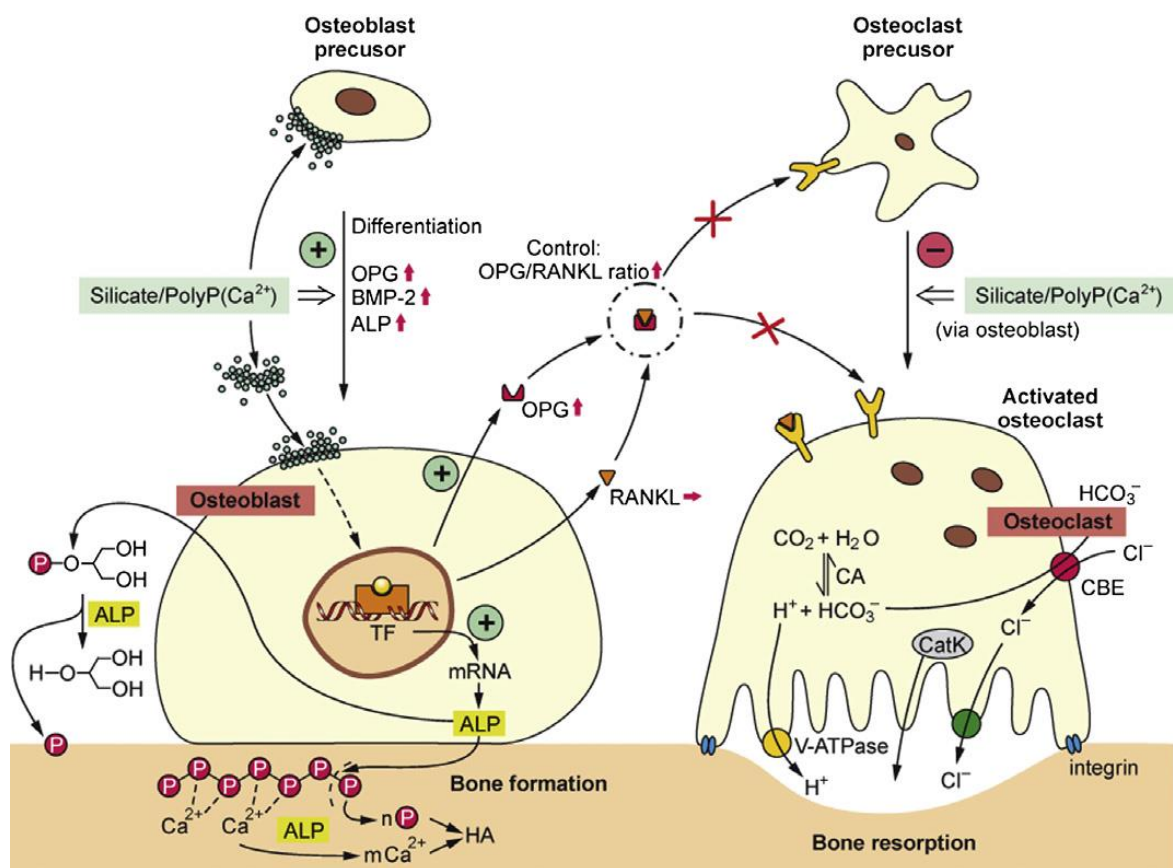


*Obr. 33 HA/kolagen scaffold – detail mineralizace kolagenových vláken [82]*

### 5.6.3 Polyfosforečnan

Polyfosforečnan vápenatý je chemická látka syntetizovaná v živých organismech. Kostní tkáň obsahuje buňky zvané osteoblasty. Vylučují buněčnou hmotu bohatou na kolagen, do které se později ukládá fosforečnan vápenatý. Osteoblastické buňky produkují enzym ALP (alkalická fosfatáza). Tento enzym umožňuje štěpit fosforečnanové vazby. Díky tomuto procesu se získávají fosforečnanové a vápenaté ionty, které jsou dále využity pro stavbu kostní tkáně tvořené z velké části HA.

Oblasti se zvýšenou osifikací se vyznačují zvýšenými hodnotami enzymu. Přítomnost polyfosforečnanu vápenatého vyvolává výraznou odezvu buněk a rostoucí aktivitu ALP. Lze tedy říci, že při užití polyfosforečnanu dochází k rychlejšímu vzniku nové kostní tkáně. Vliv polyfosforečnanu vápenatého a dalších látek na proces osifikace lze vidět na obr. 34. [83]



Obr. 34 Schéma vlivu polyfosforečnanu a dalších látek na vznik a resorpci kostní tkáně [83]

## 6 Experimentální cíle práce

Hlavním experimentálním cílem práce bylo popsat fázové změny ve dvousložkovém fosforečnanu vápenatém (BCP) a zhodnotit výslednou mikrostrukturu daného materiálu. Byly provedeny následující dílčí kroky:

- Příprava HA a TCP suspenzí vhodných pro přípravu keramické směsi
- Příprava hutných BCP disků o poměru HA/TCP: 80/20, 50/50, 20/80
- Popis struktury slinutých vzorků
- Rentgenová difrakční analýza slinutých vzorků

## 7 Experimentální část

### 7.1 Složení a příprava keramických suspenzí

Pro přípravu disků byly připraveny keramické suspenze se složením 32,5 obj.% HA a 36,3 obj.% TCP. Pro přípravu suspenzí byly použity následující chemikálie:

1. Kalcinovaný HA prášek ( $4.7 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$  po kalcinaci  $1000^\circ\text{C}/3\text{h}$ ) (tri-calcium phosphate extra pure,  $66 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ , Riedel-de Haen, Německo)
2. TCP prášek (Calcium phosphate, purum pa > 96%, Honeywell, Steinheim, Německo)
3. Deionizovaná voda
4. Quetol 651 (EGDGE, Electron microscopy sciences, Hatfield, USA), epoxidová pryskyřice
5. DPTA (dípropylentriamin, Sigma-Aldrich CHEMIE, Německo), tvrdidlo na bázi aminů
6. Darvan 821A (R.T. Vanderbilt Company, USA), disperzant.

Příprava keramických disků zahrnovala odměření a odvážení jednotlivých složek dle vypočítaného složení. Suspenze obsahující kalcinovaný HA prášek měla složení podle tabulky 2, suspenze obsahující TCP prášek podle tabulky 3.

Tabulka 2 HA suspenze

<i>Složení</i>	<b>HA</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>EGDGE</b>	<b>DPTA</b>	<b>DARVAN</b>
<b>obj.%</b>	32,50	54,12	9,02	3,32	1,03
<b>hm.%</b>	59,92	31,48	6,05	1,82	0,72

Tabulka 3 TCP suspenze

<i>Složení</i>	<b>TCP</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>EGDGE</b>	<b>DPTA</b>	<b>DARVAN</b>
<b>obj.%</b>	36,3	51,11	8,52	3,14	0,92
<b>hm.%</b>	63,23	28,91	5,55	1,67	0,63

Byla odvážena deionizovaná voda a do ní pipetou přidána epoxidová pryskyřice Quetol 651 a disperzant Darvan 821A. Vzniklý roztok byl míchán na elektromagnetických míchačkách rychlostí 250 ot./min po dobu 5 minut, aby došlo k homogenizaci.

Poté byl roztok přelit do atritoru (Union Process, HD01/HDDM CE, USA). K roztoku bylo přidáno 800g kuliček ZrO<sub>2</sub> o průměru 1 mm. Následně byl za stálého míchání 300 ot./min přidáván kalcinovaný HA. Mlecí nádoba byla během procesu mletí chlazena průtokem vody kolem nádoby (teplota vody  $\sim 16^\circ\text{C}$ ). Po přidání veškeré navážky kalcinovaného HA byly otáčky zvýšeny na 500 ot./min. Suspenze byla mleta po dobu 3 hodin.

Podobným způsobem byla připravena i suspenze z TCP prášku. Doba mletí však trvala 8 hodin.

Z připravené HA a TCP suspenze byly následně vytvořeny směsi smícháním v poměru HA/TCP 80/20, 50/50 a 20/80. Smíchání v uvedených poměrech bylo uvažováno vzhledem k hmotnosti prášku.

## 7.2 Příprava vzorků, sušení a tepelné zpracování

Do připravených směsí bylo přidáno tvrdidlo. Po přidání byla směs 30 s míchána z důvodu homogenizace tvrdidla a suspenzí.

Připravené keramické směsi byly přelity do připravených forem, které byly předem lehce vymazány parafinovým olejem. Gelace disků probíhala při pokojové teplotě. Formy byly zakryty, aby nedošlo k jejich vysychání. Poté byly vzorky přemístěny do klimatizační komory (Weiss, WK3 180/40, Německo) k řízenému sušení.

V počáteční fázi byly vzorky sušeny v klimatizační komoře při 20°C a relativní vlhkosti 95 %. Během sušení byl sledován procentuální úbytek vody ve struktuře. Po dosažení úbytku vody více než 40 %, byl režim sušení přepnut na 20°C při 85% relativní vlhkosti. Při úbytku 80 % vody bylo řízené sušení ukončeno a vzorky byly vytaženy a volně dosychaly v laboratoři.

Vysušené vzorky byly nejdříve vyžháný při teplotě 1000°C po dobu 1h. Během této operace byla ze struktury odstraněna pojiva. Po žhání byly vzorky slinovány (Clasic, HTC1600C, Česká republika). Režimy žhání a následného slinování jsou uvedeny v tabulce 4.

*Tabulka 4 Režimy žhání a slinování*

<b>Režim</b>	<b>Ohřev</b>	<b>Výdrž</b>	<b>Chladnutí</b>
<b>Žhání 1000°C</b>	20-500°C 0,2°C/min 500-1000°C 2°C/min	1000°C/1h	1000-20°C 10°C/min
<b>Slinování 1250°C</b>	20-900°C 10°C/min 900-950°C 5°C/min 950-1250°C 2°C/min	1250°C/2h	1250°C-30°C 10°C/min

## 7.3 Příprava vzorků pro skenovací elektronový mikroskop (SEM) a rentgenovou difrakční analýzu (RTG)

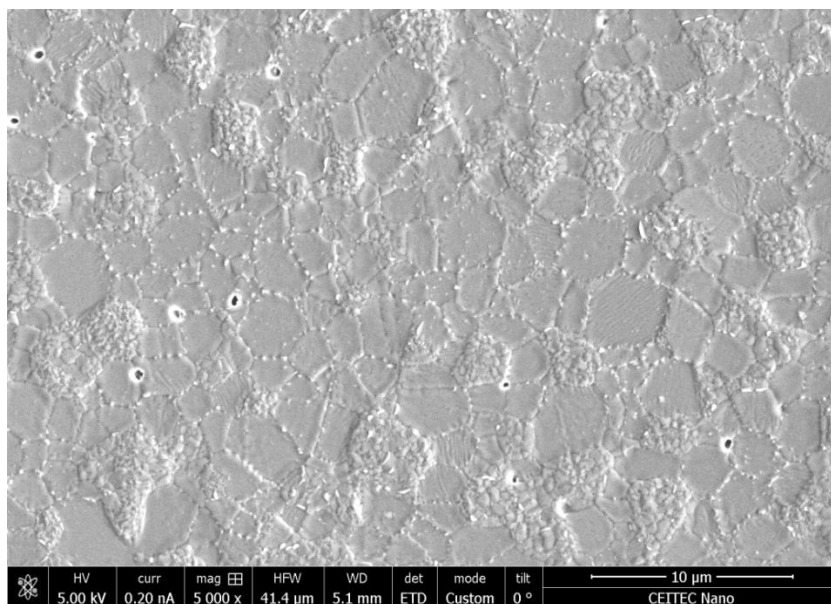
Ze slinutých vzorků byly zhotoveny výbrusy. Příprava na SEM analýzu zahrnovala broušení (brusné papíry zrnitosti 500, 800 a 1000), leštění (leštící pasta zrnitosti 9, 3 a 1 µm) a tepelné leptání (1000°C po dobu 1 hodiny). Poté bylo provedeno nauhličení vzorků a vzorky byly pozorovány na elektronovém mikroskopu (SEM, VERIOS 400L, FEI, Brno), aby bylo možné vyhodnotit jejich mikrostrukturu.

Kromě mikrostruktury bylo cílem zhodnotit výsledné fázové složení vzorků. Proto byly slinuté disky rozdrceny na prášek a provedena RTG analýza (smartlab 3 kW, Rigaku, Japonsko), jejíž výsledky byly porovnány s teoretickými výpočty získanými pomocí chemických rovnic.

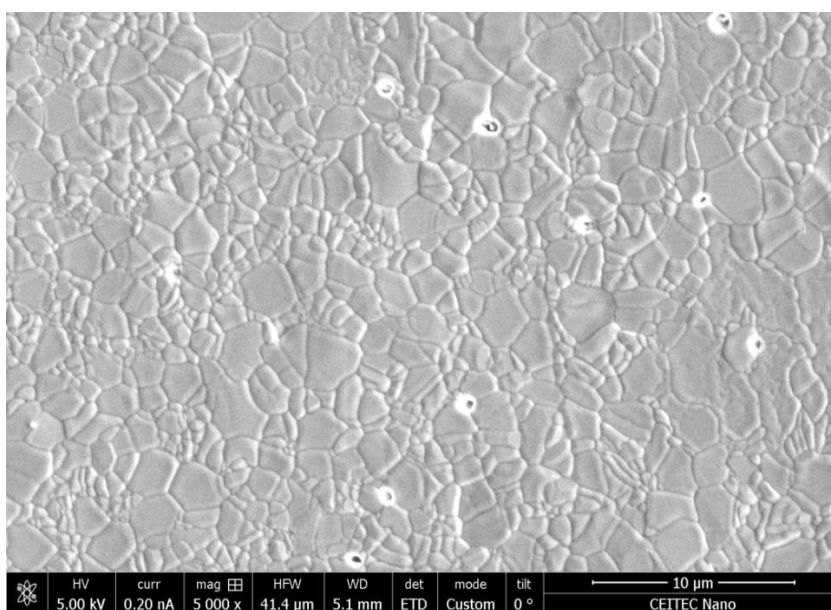
## 8 Výsledky experimentů a jejich diskuze

Výsledné mikrostruktury vzorků získané z elektronového mikroskopu jsou znázorněny na obr. 35 – 37. Jednotlivé vzorky se liší poměrem HA/TCP. V mikrostruktuře především u vzorku 80/20 lze rozlišit dva druhy zrn. Velká zrna pravděpodobně představují TCP, zatímco zrna HA jsou malá. U vzorků 50/50 a 20/80 se tyto dvojfázové oblasti již zřetelně nevyskytují. Struktura 50/50 je z hlediska velikosti zrn rovnoměrná a u struktury 20/80 převažují velká zrna TCP.

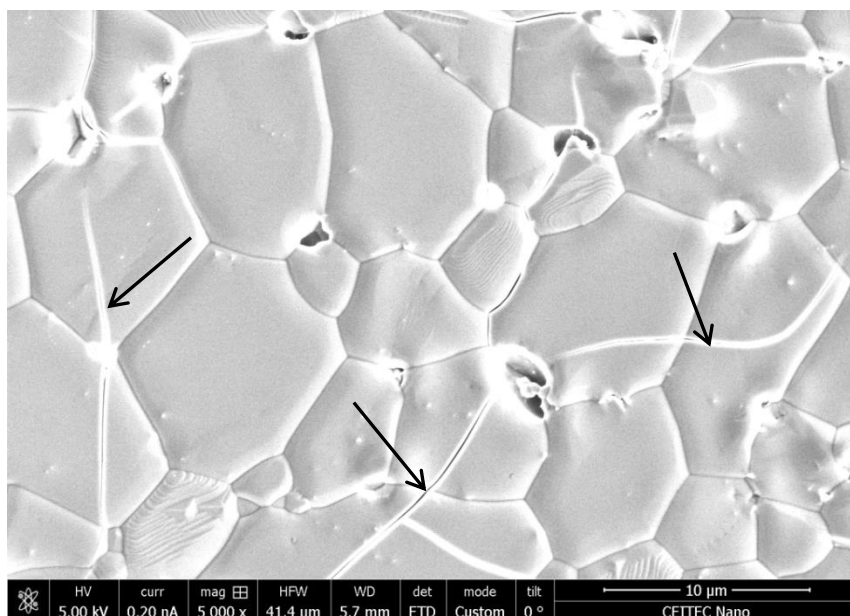
Na obr. 37 jsou ve struktuře patrné praskliny. Jsou způsobeny teplotní přeměnou  $\alpha$ -TCP na  $\beta$ -TCP, při které dochází ke změně objemu. Praskliny pravděpodobně zhorší mechanické vlastnosti materiálu.



*Obr. 35 Vzorek s poměrem HA/TCP 80/20*



*Obr. 36 Vzorek s poměrem HA/TCP 50/50*



Obr. 37 Vzorek s poměrem HA/TCP 20/80 (šipky naznačují trhliny v materiálu)

Při RTG analýze slinutých vzorků bylo zjištěno, že ve struktuře dochází ke změně poměru HA/TCP vůči připravenému složení. Z předchozích měření je již známo, že TCP prášek nelze považovat za dokonale čistou látku, ale obsahuje určité množství pyrofosforečnanu vápenatého (CPP). Pro popis změny fázového složení byla navržena následující rovnice:

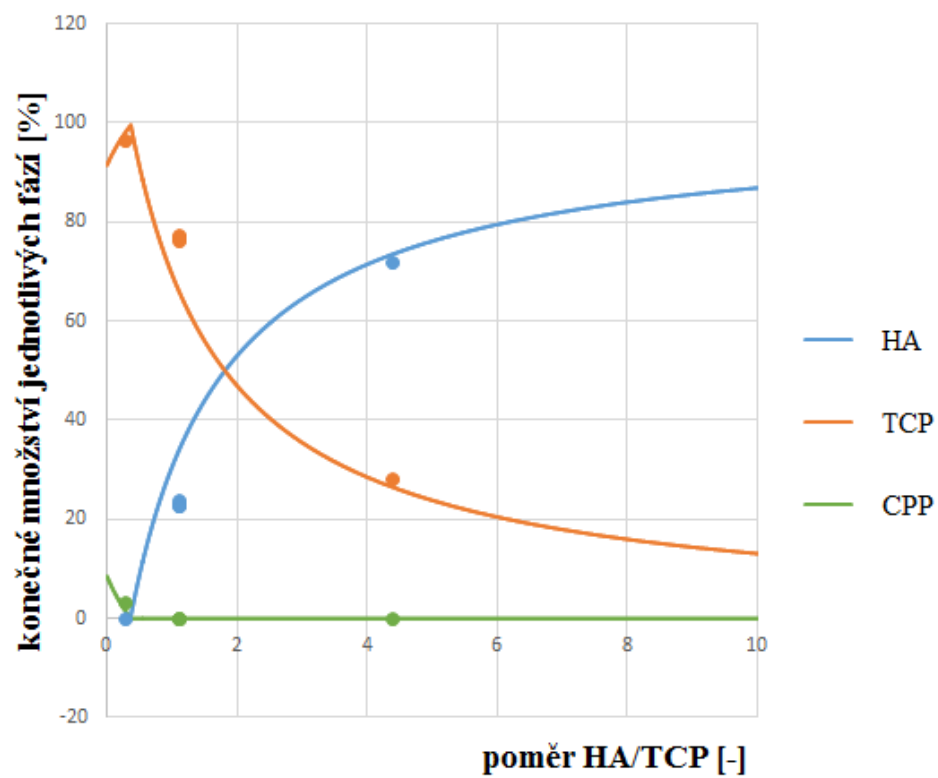


Z této chemické rovnice je možné spočítat teoretické hodnoty procentuálního zastoupení jednotlivých látek ve slinovaných materiálech. Aby došlo k úplnému odstranění CPP, musí být ve struktuře dostatečné množství HA, se kterým pyrofosforečnan reaguje. Tabulka 4 zobrazuje složení zkoumaných vzorků z BCP. Lze si všimnout dobré teoretických a experimentálních hodnot.

Tabulka 4 Složení BCP

<i>Neslinuté vzorky</i>				<i>Teoretické hodnoty</i>			<i>Experimentální hodnoty (RTG)</i>		
HA	TCP	CPP	HA/TCP	HA	TCP	CPP	HA	TCP	CPP
50	45,75	4,25	1,092896	33,5	66,5	0	23,3	76,7	0
20	73,2	6,8	0,273224	0	97,3	2,7	0	96,7	3,3
80	18,3	1,7	4,371585	73,4	26,6	0	71,8	28,2	0

Na obr. 38 je znázorněn graf, který popisuje procentuální množství jednotlivých složek směsi při určitém poměru HA/TCP. Z grafu je patrné, že body znázorňující výsledky experimentálního měření přibližně odpovídají křivkám získaným z teoretických výpočtů.



Obr. 38 Množství jednotlivých složek materiálu v závislosti na poměru HA/TCP (plné čáry reprezentují teoretické hodnoty)



## 9 Závěr

Hlavním cílem bakalářské práce bylo vytvořit rešerši shrnující poznatky z oblasti keramických materiálů na bázi fosforečnanů vápenatých. Největší pozornost byla soustředěna na porézní keramiky a jejich biologickou interakci s tělním prostředím, které se začíná stále více využívat v různých oblastech medicíny.

V teoretické části byly popsány jednotlivé druhy biokeramik (především bioaktivní materiály), hlavní výhody vícefázových fosforečnanů vápenatých oproti čistým HA a TCP materiálům (například rozpustnost) a jejich možnosti uplatnění v lékařské praxi především jako porézní implantáty kostní tkáně (označované anglickým slovem „scaffolds“). Tyto podpůrné struktury představují vynikající možnost léčby kostních defektů a lze je využít jako dobrou náhradu kostních štěpů.

Praktická část byla zaměřena na přípravu směsných BCP keramik o různém složení. Byly zhotoveny hutné BCP disky ze směsí s různým poměrem HA/TCP a porovnány výsledky experimentálního zkoumání připravených vzorků s modelem změn fázového složení keramik po slinutí. Podle ověřeného modelu rozpadu HA v BCP jsme schopni připravit BCP keramiku s požadovaným složením.

## 10 Použitá literatura

- [1] FISCHMAN, Gary., Alexis. CLARE a Larry L. HENCH. *Bioceramics: materials and applications*. Westerville, Ohio: American Ceramic Society, c1995. ISBN 0944904823.
- [2] BLACK, Jonathan a Garth HASTINGS. *Handbook of biomaterial properties*. London: Chapman & Hall, 1998. ISBN 9780412603303.
- [3] SHI, Donglu. *Introduction to biomaterials*. Hackensack, NJ: World Scientific, c2006. ISBN 7-302-10807-2.
- [4] ROSETI, Livia, Valentina PARISI, Mauro PETRETTA, Carola CAVALLO, Giovanna DESANDO, Isabella BARTOLOTTI a Brunella GRIGOLO. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering: C*. 2017, 78, 1246-1262. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>. ISSN 0928-4931. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493117317228>
- [5] SHAMOS, MORRIS H. a LEROY S. LAVINE. Piezoelectricity as a Fundamental Property of Biological Tissues. *Nature* [online]. 1967, **213**(5073), 267-269 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1038/213267a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/213267a0>
- [6] RIBEIRO, Clarisse, Vítor SENCADAS, Daniela M. CORREIA a Senentxu LANCEROS-MÉNDEZ. Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2015, **136**, 46-55 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.08.043. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776515301600>
- [7] PARK, Joon Bu. a Roderic S. LAKES. *Biomaterials: an introduction*. 3rd ed. New York: Springer, c2007. ISBN 978-0-387-37880-0.
- [8] KARAGEORGIOU, V a D KAPLAN. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* [online]. 2005, 26(27), 5474-5491 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205001511>
- [9] WONG, Joyce Y. a Joseph D. BRONZINO. *Biomaterials*. Boca Raton: CRC Press, c2007. ISBN 978-0849378881.
- [10] Osteosynthesis 2 [online]. In: . [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: [http://www.hermes.ms/instruments/osteosynthesis\\_2.htm](http://www.hermes.ms/instruments/osteosynthesis_2.htm)
- [11] BOSE, Susmita, Mangal ROY a Amit BANDYOPADHYAY. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology* [online]. 2012, 30(10), 546-554 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.07.005. ISSN 01677799. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779912001151>
- [12] PAITAL, Sameer R. a Narendra B. DAHOTRE. Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies. *Materials Science and Engineering: R: Reports* [online]. 2009, 66(1-3), 1-70 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.mser.2009.05.001. ISSN 0927796X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927796X09000783>
- [13] HENESS, Greg a Besim BEN-NISSAN. *Innovative Bioceramics*. 2003/11/30, 27.
- [14] BEST, S.M., A.E. PORTER, E.S. THIAN a J. HUANG. *Bioceramics: Past, present and for the future: Past, present and for the future*. *Journal of the European Ceramic Society*. 2008, 28(7), 1319-1327. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2007.12.001>. ISSN 0955-2219. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955221907005961>

- [15] KOKUBO, Tadashi. Bioceramics and their clinical applications. Cambridge, England: Woodhead Pub. and Maney Pub. on behalf of Institute of Materials, Minerals & Mining, 2008. ISBN 1845694228.
- [16] MURPHY, William L., Jonathan BLACK a Garth W. HASTINGS. Handbook of biomaterial properties. Second edition. New York: Springer, 2016. ISBN 978-1-4939-3303-7.
- [17] CAO, Wanpeng, HENCH, Larry L. Bioactive materials. *Ceramics International*. 1996, roč. 22, č. 6, s. 493-507
- [18] REY, C., C. COMBES, C. DROUET a D. GROSSIN. Bioactive Ceramics: Physical Chemistry. *Comprehensive Biomaterials*. Elsevier, 2011
- [19] Fluoroapatie [online]. In: . [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: <https://www.mindat.org/photo-263720.html>
- [20] LEGEROS, Racquel Z., C. COMBES, C. DROUET a D. GROSSIN. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics: Physical Chemistry. *Clinical Materials*. Elsevier, 1993, 14(1): 65-88.
- [21] LEGEROS, Racquel Zapanta. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. *Chemical Reviews* [online]. 2008, 108(11), 4742-4753 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1021/cr800427g. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr800427g>
- [22] CHALASANI, Rajeev, Laura POOLE-WARREN, R. Max CONWAY a Besim BEN-NISSAN. Porous Orbital Implants in Enucleation: A Systematic Review: A Systematic Review. *Survey of Ophthalmology*. 2007, 52(2), 145-155. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2006.12.007>. ISSN 0039-6257. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039625706002645>
- [23] DOBOŠ, P. Příprava biokeramických materiálů pro medicínské aplikace. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 33 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Dr. Ing. Martin Palou.
- [24] CARRODEGUAS, R.G. a S. DE AZA. A-Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomaterialia*. 2011, 7(10): 3536-3546.
- [25] HENCH, Larry L. An Introduction to bioceramics. Second edition. London: Imperial College Press, 2013. ISBN 978-1-908977-15-1.
- [26] REZWAN, K., Q.Z. CHEN, J.J. BLAKER a Aldo Roberto BOCCACCINI. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006, 27(18), 3413-3431. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.039>. ISSN 0142-9612. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961206001232>
- [27] JONES, Julian R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia* [online]. 2013, 9(1), 4457-4486 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.08.023. ISSN 17427061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706112003996>
- [28] BREZNY, Rasto a David J. GREEN. Mechanical Behavior of Cellular Ceramics. CAHN, R. W., P. HAASEN a E. J. KRAMER, ed. *Materials Science and Technology* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2006, 2006-09-15 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1002/9783527603978.mst0125. ISBN 3527313958. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527603978.mst0125>
- [29] SCHEFFLER, Michael a Paolo COLOMBO. Cellular ceramics structure, manufacturing, properties and applications. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. ISBN 352760670X.
- [30] Foam ceramic filters [online]. In: [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: <http://www.profound.cz/en/products/foam-ceramic-filters>

- [31] COLOMBO, P. Conventional and novel processing methods for cellular ceramics. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences [online]. 2006, 364(1838), 109-124 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1098/rsta.2005.1683. ISSN 1364-503X. Dostupné z: <http://rsta.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsta.2005.1683>
- [32] STUDART, Andre R., GONZENBACH, Urs T., TERVOORT, Elena, GAUCKLER, Ludwig J, SCHMIDT, H. K. Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. Journal of the American Ceramic Society. 2006, roč. 89, č. 6, s. 47-67.
- [33] HUTMACHER, Dietmar W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium [online]. Elsevier, 2000, 2000, s. 175-189 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/B978-008045154-1.50021-6. ISBN 9780080451541. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080451541500216>
- [34] SIGMUND, Wolfgang M., BELL, Nelson S., BERGSTRÖM, Lennart. Novel Powder Processing Methods for Advanced Ceramics. Journal of the American Ceramic Society. 2004, roč. 83, č. 7, s. 1557-1574
- [35] MIRONOV, Vladimir, THOMAS BOLAND, Thomas TRUSK, Gabor FORGACS a Roger R. MARKWALD. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. Trends in Biotechnology. 2003, 21(4), 157-161. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00033-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00033-7). ISSN 0167-7799. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779903000337>
- [36] NOVOTNÁ, Lenka. Bioceramic materials for advanced medical applications. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2015. 99 p. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Jaroslav Cihlář, CSc.
- [37] HENCH, L. L., R. J. SPLINTER, W. C. ALLEN a T. K. GREENLEE. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. Journal of Biomedical Materials Research [online]. 1971, 5(6), 117-141 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1002/jbm.820050611. ISSN 0021-9304. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.820050611>
- [38] ALBREKTSSON, T. a C. JOHANSSON. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. European Spine Journal [online]. 2001, 10, S96-S101 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1007/s005860100282. ISSN 0940-6719. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s005860100282>
- [39] CAO, Wanpeng, HENCH, Larry L. Bioactive materials. Ceramics International. 1996, roč. 22, č. 6, s. 493-507
- [40] ENGIN, N. Özgür a A. Cüneyt TAŞ. Preparation of Porous Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> and β-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Bioceramics. Journal of the American Ceramic Society [online]. 2000, 83(7), 1581-1584 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1111/j.1151-2916.2000.tb01434.x. ISSN 00027820. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1151-2916.2000.tb01434.x>
- [41] RUMPLER, M., A. WOESZ, J. W.C DUNLOP, J. T VAN DONGEN, P. FRATZL, P. CHAVASSIEUX, G. BOIVIN, M. MELIN a D. HARTMANN. The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. Journal of The Royal Society Interface. 2008, 5(27): 1173-1180.
- [42] DOROZHKIN, Sergey. Bioceramics of Calcium Orthophosphates. 2010/03/01, 31, s. - 1485, 1465 s.. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.050.
- [43] LIU, Dean-Mo. Influence of porosity and pore size on the compressive strength of porous hydroxyapatite ceramic. Ceramics International. 1997, 23(2), 135-139. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0272-8842\(96\)00009-0](https://doi.org/10.1016/S0272-8842(96)00009-0). ISSN 0272-8842. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884296000090>

- [44] GIBSON, Lorna J. a Michael F. ASHBY. Cellular Solids [online]. Cambridge: Cambridge University Press, 1997 [cit. 2018-05-01]. ISBN 9781139878326.
- [45] STASTNY, Premysl, Zdenek CHLUP, Dominika KALASOVA, Tomas ZIKMUND, Jozef KAISER a Martin TRUNEC. Epoxy-based gelcasting of machinable hydroxyapatite foams for medical applications. Journal of the American Ceramic Society [online]. , - [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1111/jace.15523. ISSN 00027820. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jace.15523>
- [46] MIRANDA, Pedro, Antonia PAJARES, Eduardo SAIZ, Antoni P. TOMSIA a Fernando GUIBERTEAU. Mechanical properties of calcium phosphate scaffolds fabricated by robocasting. Journal of Biomedical Materials Research Part A [online]. 2008, 85A(1), 218-227 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1002/jbm.a.31587. ISSN 15493296. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.31587>
- [47] ČIHÁK, Radomír. Anatomie. Třetí, upravené a doplněné vydání. Ilustroval Ivan HELEKAL, ilustroval Jan KACVINSKÝ, ilustroval Stanislav MACHÁČEK. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-3817-8.
- [48] LÜLLMANN-RAUCH, Renate. Histologie. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.
- [49] BALÍK, Karel a Tomáš SUCHÝ. Biokompozitní náhrady kostní tkáně [online]. Praha: Středisko společných činností AV ČR, v. v. i., pro Ústav struktury, 2015 [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: [www.vedakolemnas.cz](http://www.vedakolemnas.cz)
- [50] HÁLEK, Jan, Václav LICHNOVSKÝ a Zdeňka MICHALÍKOVÁ. Přehled histologie člověka v obrazech. Olomouc: Univerzita Palackého, Lékařská fakulta, 2002. ISBN 80-244-0512-1.
- [51] DUNGL, Pavel. Ortopedie. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2014. ISBN 9788024743578.
- [52] CYPHER, Thomas J. a Jordan P. GROSSMAN. Biological principles of bone graft healing. The Journal of Foot and Ankle Surgery. 1996, 35(5), 413-417. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1067-2516\(96\)80061-5](https://doi.org/10.1016/S1067-2516(96)80061-5). ISSN 1067-2516. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1067251696800615>
- [53] DELIGIANNI, Despina D, Nikoleta D KATSALA, Petros G KOUTSOUKOS a Yiannis F MISSIRLIS. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. Biomaterials [online]. 2000, 22(1), 87-96 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00174-5. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961200001745>
- [54] ALBEE, Fred H. STUDIES IN BONE GROWTH: TRIPLE CALCIUM PHOSPHATE AS A STIMULUS TO OSTEOGENESIS. Annals of Surgery. 1920/01/, 71(1), 32-39. ISSN 0003-4932. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1410453/>
- [55] NERY, E. B., K. L. LYNCH, W. M. HIRTHE a K. H. MUELLER. Bioceramic Implants in Surgically Produced Infrabony Defects. Journal of Periodontology [online]. 1975, 46(6), 328-347 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1902/jop.1975.46.6.328. ISSN 0022-3492. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1902/jop.1975.46.6.328>
- [56] DENISSEN, Harry W. a Klaas de GROOT. Immediate dental root implants from synthetic dense calcium hydroxylapatite. The Journal of Prosthetic Dentistry [online]. 1979, 42(5), 551-556 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/0022-3913(79)90253-1. ISSN 00223913. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022391379902531>
- [57] GROOT, Klaas de. Bioceramics of calcium phosphate. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c1983. ISBN 0849364566.



- [58] DOROZHKIN, Sergey V. Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. *Acta Biomaterialia*. 2012, 8(3), 963-977. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.09.003>. ISSN 1742-7061. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706111003874>
- [59] NERY, Edmundo B., Racquel Z. LEGEROS, Kenneth L. LYNCH a Kelvin LEE. Tissue Response to Biphasic Calcium Phosphate Ceramic With Different Ratios of HA/ $\beta$ TCP in Periodontal Osseous Defects. *Journal of Periodontology* [online]. 1992, 63(9), 729-735 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1902/jop.1992.63.9.729. ISSN 0022-3492. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1902/jop.1992.63.9.729>
- [60] LEGEROS, R.Z. Calcium Phosphate Materials in Restorative Dentistry: a Review. *Advances in Dental Research* [online]. 2016, 2(1), 164-180 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1177/08959374880020011101. ISSN 0895-9374. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/08959374880020011101>
- [61] CAROLINE VICTORIA, E a F.D. GNANAM. Synthesis and characterisation of biphasic calcium phosphate. 2002/01/01, 16, s. -14, 12 s.
- [62] KIVRAK, Nezahat a A. Cuneyt TAŞ. Synthesis of Calcium Hydroxyapatite-Tricalcium Phosphate (HA-TCP) Composite Bioceramic Powders and Their Sintering Behavior. *Journal of the American Ceramic Society* [online]. 1998, 81(9), 2245-2252 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1111/j.1151-2916.1998.tb02618.x. ISSN 00027820. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1151-2916.1998.tb02618.x>
- [63] BROWN, O., M. MCAFEE, S. CLARKE a F. BUCHANAN. Sintering of biphasic calcium phosphates. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2010, 21(8), 2271-2279 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1007/s10856-010-4032-6. ISSN 0957-4530. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-010-4032-6>
- [64] LI, Yan Bao, Dong Xu LI a Wen Jian WENG. In Vitro/i Dissolution Behavior of Biphasic Tricalcium Phosphate Composite Powders Composed of  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate and  $\beta$ -Tricalcium Phosphate. *Key Engineering Materials* [online]. 2008, 368-372, 1206-1208 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.368-372.1206. ISSN 1662-9795. Dostupné z: <http://www.scientific.net/KEM.368-372.1206>
- [65] MASAOKA, Tomokazu, Toshitaka YOSHII, Masato YUASA, et al. Bone Defect Regeneration by a Combination of a  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Scaffold and Bone Marrow Stromal Cells in a Non-Human Primate Model. *The Open Biomedical Engineering Journal* [online]. 2016, 10(1), 2-11 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.2174/1874120701610010002. ISSN 1874-1207. Dostupné z: <http://benthamopen.com/ABSTRACT/TOBEJ-10-2>
- [66] DRAENERT, Miriam, DRAENERT, Alice, DRAENERT Klaus. Osseointegration of hydroxyapatite and remodeling-resorption of tricalciumphosphate ceramics. *Microscopy Research and Technique*. 2013, roč. 76, č. 4, s. 370-380
- [67] YAMADA, S. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials* [online]. 1997, 18(15), 1037-1041 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/S0142-9612(97)00036-7. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961297000367>
- [68] EBRAHIMI, Mehdi, Michael G. BOTELHO a Sergey V. DOROZHKIN. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, 71, 1293-1312 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.msec.2016.11.039. ISSN 09284931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116316721>

- [69] GUHA, Avijit Kumar, Shashi SINGH, R. KUMARESAN, Suprabha NAYAR a Arvind SINHA. Mesenchymal cell response to nanosized biphasic calcium phosphate composites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2009, 73(1), 146-151 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.05.009. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777650900191X>
- [70] KANNAN, S., I.A.F. LEMOS, J.H.G. ROCHA a J.M.F. FERREIRA. Synthesis and characterization of magnesium substituted biphasic mixtures of controlled hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate ratios. *Journal of Solid State Chemistry* [online]. 2005, 178(10), 3190-3196 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.jssc.2005.08.003. ISSN 00224596. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022459605003543>
- [71] GOMES, S., G. RENAUDIN, E. JALLOT a J.-M. NEDELEC. Structural Characterization and Biological Fluid Interaction of Sol–Gel-Derived Mg-Substituted Biphasic Calcium Phosphate Ceramics. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2009, 1(2), 505-513 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1021/am800162a. ISSN 1944-8244. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/am800162a>
- [72] TAMAI, Masato, Kazuo ISAMA, Ryusuke NAKAOKA a Toshie TSUCHIYA. Synthesis of a novel  $\beta$ -tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties. *Journal of Artificial Organs* [online]. 2007, 10(1), 22-28 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1007/s10047-006-0363-y. ISSN 1434-7229. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10047-006-0363-y>
- [73] DOROZHKIN, Sergey V. Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. *Acta Biomaterialia*. 2012, 8(3), 963-977. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.09.003>. ISSN 1742-7061. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706111003874>
- [74] FELLAH, Borhane H., Olivier GAUTHIER, Pierre WEISS, Daniel CHAPPARD a Pierre LAYROLLE. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials* [online]. 2008, 29(9), 1177-1188 [cit. 2018-05-02]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.11.034. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961207009660>
- [75] LOBO, Sonja Ellen, Francisco Henrique Lanna WYKROTA, Ana Carolina Marques Barbosa OLIVEIRA, Irina KERKIS, Germán Bohorquez MAHECHA a Humberto José ALVES. Quantification of bone mass gain in response to the application of biphasic bioceramics and platelet concentrate in critical-size bone defects. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2009, 20(5), 1137-1147 [cit. 2018-05-02]. DOI: 10.1007/s10856-008-3660-6. ISSN 0957-4530. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-008-3660-6>
- [76] SUNEELKUMAR, Chinni, Krithika DATTA, Manali SRINIVASAN a Sampath KUMAR. Biphasic calcium phosphate in periapical surgery. *Journal of Conservative Dentistry* [online]. 2008, 11(2), 92- [cit. 2018-05-02]. DOI: 10.4103/0972-0707.44059. ISSN 0972-0707. Dostupné z: <http://www.jcd.org.in/text.asp?2008/11/2/92/44059>
- [77] EBRAHIMI, Mehdi, Michael G. BOTELHO a Sergey V. DOROZHKIN. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, 71, 1293-1312 [cit. 2018-05-02]. DOI: 10.1016/j.msec.2016.11.039. ISSN 09284931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116316721>

- [78] LOBO, Sonja Ellen a Treena Livingston ARINZEH. Biphasic Calcium Phosphate Ceramics for Bone Regeneration and Tissue Engineering Applications. *Materials. Molecular Diversity Preservation International*, 2010/02/, 3(2), 815-826. DOI: 10.3390/ma3020815. ISSN 1996-1944. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5513510/>
- [79] SARAVANAN, S., R.S. LEENA a N. SELVAMURUGAN. Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016, 93, 1354-1365. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.112>. ISSN 0141-8130. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016301155>
- [80] KONG, Lijun, Yuan GAO, Wenling CAO, Yandao GONG, Nanming ZHAO a Xiufang ZHANG. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2005, 75A(2), 275-282 [cit. 2018-05-02]. DOI: 10.1002/jbm.a.30414. ISSN 1549-3296. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.30414>
- [81] WAHL, Denys A., Eleftherios SACHLOS, Chaozong LIU a Jan T. CZERNUSZKA. Controlling the processing of collagen-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007, 18(2), 201-209. DOI: 10.1007/s10856-006-0682-9. ISSN 1573-4838. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0682-9>
- [82] CAMPOS, Doris Moura, Karine ANSELME a Glória Dulce de Almeida SOARES. In Vitro Biological Evaluation of 3-D Hydroxyapatite/Collagen (50/50 wt. (%)) Scaffolds. *Materials Research* [online]. 2012, 15(1), 151-158 [cit. 2018-05-02]. DOI: 10.1590/S1516-14392011005000099. ISSN 1980-5373. Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S151614392012000100021&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151614392012000100021&lng=en&tlng=en)
- [83] MÜLLER, Werner E.G., Xiaohong WANG, Bärbel DIEHL-SEIFERT, et al. Inorganic polymeric phosphate/polyphosphate as an inducer of alkaline phosphatase and a modulator of intracellular Ca<sup>2+</sup> level in osteoblasts (SaOS-2 cells) in vitro. *Acta Biomaterialia* [online]. 2011, 7(6), 2661-2671 [cit. 2018-05-02]. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.03.007. ISSN 17427061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S174270611100119X>